

Г. В. Дорожинський, В. П. Маслов, Ю. В. Ушенін

**Сенсорні прилади на
основі поверхневого плазмонного резонансу**

Монографія

Київ, НТУУ «КПІ» 2016 р.

УДК 537.876; 535.375

Дорожинський Г.В., Маслов В.П., Ушенін Ю.В. Сенсорні прилади на основі поверхневого плазмонного резонансу. Монографія /

Відповідальний редактор Порєв В.А. - Київ: НТУУ «КПІ», 2016 - 264 с.

Рекомендовано до видання Вченою радою Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут» (протокол № 3 від 14.03.2016 р.)

В монографії викладені матеріали, присвячені актуальному питанню розгляду тенденцій розвитку високочутливих приладів на основі фізичного явища поверхневого плазмонного резонансу (ППР). Наведена класифікація та розглянуто існуючі сенсори аналітичних приладів та визначено, що оптичні сенсори є більш чутливими до досліджуваних речовин. Значну увагу приділено питанням підвищення точності та чутливості приладів на основі ППР, а також галузям застосування цих приладів. Переваги цих приладів наступні: можливість вивчення процесів молекулярної взаємодії в мікронних шарах у реальному масштабі часу; малий об'єм проби досліджуваної речовини (менше 10 мкл); відсутність потреби у маркерах та флуоресцентних мітках для досліджуваної речовини (аналіту), що обумовило широке використання цього приладу в світі. Наведені технічні характеристики розроблених в Україні сенсорних приладів на явищі ППР та показані напрямки їх застосування.

Монографія призначена для наукових та інженерно-технічних співробітників, що займаються розробкою та експлуатацією сенсорних приладів, робота яких заснована на вимірюванні оптичних характеристик рідких та газоподібних речовин.

Рецензенти: *І.В. Прокопенко*, д-р. фіз.-мат. наук, проф., Інститут фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова
Національної академії наук України
В.М. Гранчак, д-р. хім. наук, проф. Інститут фізичної хімії ім. Л.В. Писаржевського
Національної академії наук України

ISBN

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут»

© Дорожинський Г.В., Маслов В.П., Ушенін Ю.В.

ЗМІСТ

Перелік скорочень.	5
Передмова	6
Розділ 1. Класифікація сенсорів аналітичних приладів	10
1.1. Електрохімічні сенсори	12
1.2. Масо-чутливі сенсори	14
1.3. Калориметричні сенсори	18
1.4. Оптичні сенсори	23
1.4.1. Флуорисцентні сенсори	23
1.4.2. Хемілюменісцентні сенсори	25
1.4.3. Абсорбційні сенсори	26
1.4.4. Сенсори на поверхневому плазмонному резонансі	26
Розділ 2. Фізичні основи поверхневого плазмонного резонансу	33
2.1. Взаємодія електромагнітного поля з речовиною	33
2.1.1. Типи плазмонів	42
2.1.2. Поверхневі електромагнітні хвилі	44
2.1.3. Умови існування поверхневого плазмонного резонансу	45
2.2. Методи збудження поверхневих плазмонів	46
Розділ 3. Принцип роботи та особливості приладів на основі явища поверхневого плазмонного резонансу	60
3.1. Принцип роботи приладів на поверхневому плазмонному резонансі.	60
3.2. Чутливість, роздільна здатність та точність приладу.	69
Розділ 4. Напрямки вдосконалення приладів на основі явища поверхневого плазмонного резонансу	78
4.1. Характеристика існуючих конструкцій приладів	78
4.2. Вдосконалення технології виготовлення та конструкції чутливого елемента приладів	79

4.3. Особливості розвитку чутливих елементів біосенсорів	86
Розділ 5. Аналіз чинників, що впливають на точність вимірювання та чутливість приладів	89
5.1. Довжина хвилі, топологія чутливого елементу та температури досліджуваного середовища та елементів оптичної схеми приладу.	89
5.2. Конструкторсько-технологічні шляхи підвищення точності вимірювання та чутливості приладів	105
Розділ 6. Модифікація поверхні чутливого елементу приладу для потреб біосенсорики	135
6.1. Підготовка поверхні чутливого елементу до іммобілізації	135
6.2. Іммобілізація рецепторів на поверхню чутливого елементу	144
6.3. Молекулярні зв'язуючі елементи: білки, пептиди, олігонуклеотиди, карбогідрати та малі органічні молекули	154
Розділ 7. Застосування приладів на основі явища поверхневого плазмонного резонансу	160
7.1. Контроль органічних та неорганічних речовин в рідинах, мікробних патогенів та забруднення повітря парами розчинників	160
7.2. Контроль продуктів харчування на наявність бактерій та токсинів.	177
7.3. Застосування приладів для потреб фармакології та медицини	192
7.4. Застосування приладів для потреб промисловості	206
7.4.1. Оптимізація складу фотополімеризаційних полімерних композицій для оптико-електронної промисловості	206
7.4.2. Контроль моторних олиф при їх експлуатації	209
7.4.3. Контроль задимлення повітря виробничих приміщень	213
Розділ 8. Вітчизняні прилади на основі явища поверхневого плазмонного резонансу	219
Посилання	230

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ

ПВВ	повне внутрішнє відбиття на межі двох середовищ
ПЗ	показник заломлення
ППР	поверхневий плазмонний резонанс
ЧЕ	чутливий елемент ППР-сенсору
ФПК	фотополімеризаційноздатна клейова композиція
d_e, d_M, d_v	товщини проміжного, металевого та діелектричного шарів
k, k_x	хвильовий вектор променю світла та його проекція
k_{SP}	хвильовий вектор поверхневого плазмону
k_M	коефіцієнт екстинції металу
n_e, n_M, n_v	показник заломлення проміжного, металевого та діелектричного шарів
n_p, n_a	показник заломлення призми та аналіту
R	коефіцієнт відбиття світла
θ	кут падіння світла θ
R_{min}	коефіцієнт відбиття світла у мінімумі графіку залежності $R(\theta)$
RIU	позасистемна одиниця вимірювання показнику заломлення
θ_{min}	кутове положення мінімуму графіку залежності $R(\theta)$
$\Delta\theta_{min}$	абсолютне значення величини кутового зсуву θ_{min}
ΔR	абсолютне значення величини зміни коефіцієнту відбиття
S_R	чутливість ППР-приладу при вимірюванні зміни R
S_θ	чутливість ППР-приладу при вимірюванні кутового зсуву $R(\theta)$
δN	абсолютна похибка вимірювання показника заломлення аналіту
ϵ	діелектрична проникність
λ	довжина хвилі

ПЕРЕДМОВА

З кінця XX ст. інтенсивно розвиваються нові напрямки в електроніці та нанооптиці, пов'язані з вивченням і застосуванням поверхневих електромагнітних хвиль. У науковій літературі такі хвилі називають також поверхневими поляритонами (англ. surface polaritons), а поверхневі електромагнітні хвилі на межі середовищ з високою провідністю (металом чи високолегованим напівпровідником) і повітрям - поверхневими плазмон-поляритонами (англ. surface plasmon polaritons), рідше - поверхневими плазмонами (англ. surface plasmons), виражаючи цим значний внесок електронної плазми (вільних носіїв заряду) у їхнє формування.

Поверхневі електромагнітні хвилі (ПЕХ) вперше були описані А. Зоммерфельдом у 1899 році для випадку поширення хвилі вздовж циліндричного провідника [1]. У 1902 р. в Університеті Джона Хопкінса (Балтімор, США) англійський фізик Р. Вуд виявив темні лінії у спектрах дифракції білого світла на металевій ґратці - аномалії Вуда: світло деяких довжин хвиль не відбивалося, а отже, його поглинала ґратка [2]. На той час він не пояснив причину такої аномалії, а лише констатував факт її існування.

У 1907 р. І. Ценніке математично описав поширення електромагнітних хвиль уздовж поверхні Землі (провідника) для пояснення далекого радіозв'язку [3]. Перше теоретичне обґрунтування аномалій Вуда було виконано Релеєм в 1907 році [4]. Динамічна теорія ґратки Релея була заснована на розкладанні розсіяного електромагнітного поля тільки вихідними хвилями. У 40-х роках це явище пояснив італійський фізик У. Фано, припустивши, що енергія світла, яке не відбивалося від ґратки, витрачалася на збудження поверхневої хвилі в ній [5]. Він обґрунтував також метод збудження поверхневих електромагнітних хвиль з використанням поверхневої дифракційної ґратки.

У п'ятдесяті роки більшість експериментальних досліджень було присвячено втратам енергії електронів в газах і на тонких плівках [6, 7].

Великим досягненням у дослідженні ПЕХ були роботи [8-10], в яких автори пояснювали аномалії Вуда втратами енергії через збудження електронів провідності, що створювало коливання в плазмі. Колективні коливання електронів провідності отримали назву плазмон.

Наприкінці шістдесятих, оптичне збудження поверхневих плазмонів за методом порушеного повного внутрішнього відбиття було продемонстровано Кретчманом та Отто [11-13]. В цих роботах було представлено два основні методи для оптичного збудження поверхневих плазмових хвиль: метод порушеного повного відбиття на межі розділу призма-речовина на основі планарних структур і дифракції на дифракційних ґратках. Піонерами у застосуванні поверхневих плазмових хвиль та порушеного повного відбиття для зондування поверхні були Ніландер і Лидберг [14]. Збудження ПЕХ широко застосовувалося для визначення характеристик тонких плівок [15, 16] і хімічного зондування [17-19]. У 1988 р. німецькі фізики В. Кноль та Б. Ротенхойсер запропонували схему і реалізували мікроскоп на поверхневих хвилях [20]. Були проведені дослідження використання дифракційних решіток для збудження поверхневих плазмонів та зондування поверхні в якості альтернативи системам на основі призм повного внутрішнього відбиття [21, 22]. Новий імпульс у дослідженні поверхневих плазмових хвиль дала праця французьких фізиків Т. Еббесена та ін. [23], які досліджували спектри пропускання металевих плівок з отворами, діаметр яких $d \ll \lambda$: якщо положення отворів було періодичним, то пропускання світла через таку систему зростало в декілька разів. Результати експериментів пояснювали тим, що світло, яке падає на металеву плівку, проходить крізь отвори, збуджуючи поверхневі плазмони, які на іншому боці отвору знову перетворювалися у світло. Ця праця стала вихідною у серії досліджень, присвячених взаємодії структурованих металевих плівок зі світлом, які сформували новий напрям фотоніки – “наноплазмоніка” [24-27].

У 1980 році шведська фірма Pharmacia почала дослідження можливостей застосування поверхневих плазмонів в аналітичному обладнанні, започаткувавши новий напрям наукових досліджень - біосенсорику. Так само як і наноплазмоніка, біосенсорика являє собою новітній багатообіцяючий напрямок науки та технології, метою якого є створення високочутливих та експресних методів аналізу, призначених головним чином для медико-біологічних досліджень. Серед інших перспективних галузей їх використання можна вказати також фармакологію, виробництво продуктів харчування, контроль довкілля та природних ресурсів, призначених для сільськогосподарського виробництва – всюди, де виникає потреба визначення концентрації певних хімічних і біологічних речовин, так званих аналітів (компонентів, які підлягають визначенню) у різних середовищах. У 1984 році були виготовлені перші аналітичні прилади на основі поверхневих плазмонів та велась розробка відповідних поверхонь чутливих елементів цих приладів [28-30]. Протягом короткого періоду Pharmacia випустила багато публікацій, в яких були описані як методики вимірювання так і обладнання, зокрема прилад BIAcore [29-33]. У 1990 році був проданий перший аналітичний прилад Biacore [34].

Використання ПЕХ у оптичному явищі поверхневого плазмонного резонансу, як основного фізичного ефекту для отримання відгуку фізичного перетворювача (тонких металевих плівок) та чутливого шару на зміну складу навколишнього середовища, уже привело до створення чутливих і швидкодіючих приладів, які випускаються фірмами Biacore (Швеція), Pharmacia Biosensor (США), Affinity Sensors (США), Reichert (Німеччина) для контролю взаємодій біологічних молекул, де кількість необхідного для вимірів матеріалу складає мікролітри і десятки мікролітрів. Останнє особливо важливо при дослідженні генного матеріалу, оскільки він не може бути отриманий у великих кількостях. До найбільш істотних переваг біосенсорів на основі ППР у порівнянні з традиційно використовуваними в

даний момент методиками (наприклад, іммуноферментний аналіз чи афінна хроматографія) варто віднести: можливість вивчати процеси молекулярної взаємодії в реальному масштабі часу і без необхідності мітити матеріали.

Дослідження взаємодії поверхневих електромагнітних хвиль з речовиною та розробка приладів на основі поверхневих плазмонів виконувалися також в Україні. В Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова Національної академії наук України експериментальні дослідження прикладних аспектів побудови біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу були розпочаті на початку 90-х років. Конструктивно завершена модель такого приладу, придатна для експлуатації в умовах лабораторій біохімічного та біофізичного профілю, була розроблена наприкінці дев'яностих років. До роботи над цим проектом були залучені висококваліфіковані фізики, програмісти та приладобудівники, які надалі склали ядро науково-виробничої групи, що продовжувала подальший розвиток та пошук шляхів застосування приладу у наукових дослідженнях.

Прилад, створений у процесі роботи, було покладено в основу модельного ряду рефрактометрів серії "Плазмон", які успішно експлуатуються в багатьох лабораторіях України та за її межами. Основною його частиною є біосенсор, який уможливорює реєстрування змін у аналіті за рахунок зняття основних оптичних параметрів.

Монографія присвячена вирішенню задач оптимізації технологічних підходів і технічних прийомів при розробці оптичних біосенсорів на основі явища поверхневого плазмонного резонансу.

РОЗДІЛ 1

КЛАСИФІКАЦІЯ СЕНСОРІВ АНАЛІТИЧНИХ ПРИЛАДІВ

Виявлення патогенних організмів, гормонів та інших відповідних аналітів вимагає створення інноваційних аналітичних приладів з підвищеною чутливістю, селективністю, високою точністю та швидкістю вимірювання, котрі базуються на різних фізичних явищах. Існуючі точні і чутливі лабораторні методи вимірювання, як правило, вимагають громіздкого і дорогого вимірювального обладнання, трудомістку підготовку досліджуваного зразка та висококваліфікований персонал для обслуговування такого обладнання. Актуальним напрямком розвитку аналітичного приладобудування є створення мініатюрних вимірювальних засобів. Мініатюризація пристроїв може бути досягнута за допомогою технології «лабораторії на чіпі» (lab on chip - LOC), яка об'єднує кілька вимірювальних функцій в одному чутливому елементі приладу. Ця технологія використовує мініатюрні вимірювальні об'єми для обробки малої дози аналіту. Перспективність такої концепції розвитку аналітичних приладів та переваги LOC систем забезпечується зниженням проби досліджуваної речовини і витрат реагентів, автоматизацією та високою швидкістю отримання результату [1]. Основним елементом конструкції аналітичних приладів побудованих за технологією LOC, котрий визначає характеристики приладу, є сенсор. Відповідно до загальновизнаної термінології, сенсор – це чутливий елемент аналітичного датчика та фізичний перетворювач (первинний перетворювач), що реагує на зміну складу аналізованого компонента (аналіту) чи параметра, функціонально зв'язаного з ним [2]. Хімічний сенсор складається з чутливого шару, що селективно реагує на визначений аналіт за допомогою хімічної реакції, та фізичного перетворювача, котрий перетворює хімічний сигнал реакції в електричний і може бути використаний для якісного чи кількісного визначення цього

аналіту [3]. Термін хімічний сенсор включає також і біологічні сенсори, що відрізняються від хімічних сенсорів наявністю на чутливому шарі біологічно активної речовини (рецептору), яка відповідає за селективність сенсора при аналізі взаємодій між біологічними об'єктами (Рис.1.1).

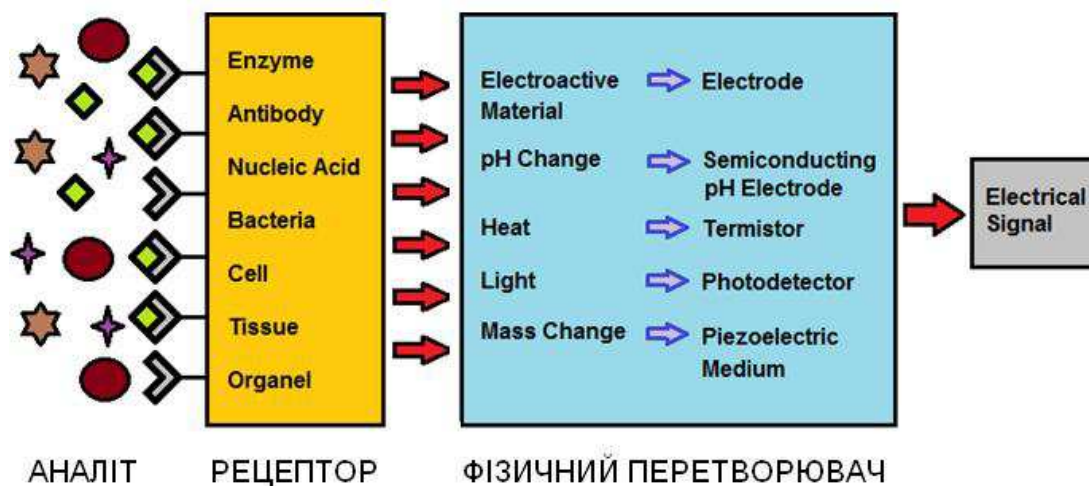


Рис. 1.1. Узагальнена схема біологічного сенсора [4].

Область чутливого елементу, де протікає власне біохімічна реакція, називають реактором. Біохімічна реакція породжує деякий сигнал, наприклад, зміну кольору, появу світлового випромінювання, зміну електричного потенціалу чи сили струму через аналіт, виділення тепла тощо. Перетворювач сприймає цей сигнал і переводить його в електричну величину, зв'язану визначеним законом з кількістю досліджуваної речовини, котра провзаємодіяла з чутливим елементом. Чутливі елементи можуть створюватися, зокрема, на основі ферментів завдяки їх високій чутливості. Реакції між ферментами (ензимами) і речовинами можна реєструвати за допомогою відповідних фізичних чи хімічних методів. Біохімічні сенсори знаходиться на стадії розвитку, запропонована велика кількість різноманітних принципів побудови таких приладів. Ці принципи конкурують між собою і є предметом багатьох досліджень [5].

По типу сигналу що реєструється, хімічні сенсори можна розділити на дві групи: 1) сенсор фізичної величини, наприклад, інтенсивності чи

поглинання відбитого світла, маси, температури [6-8] і 2) сенсори хімічної величини, наприклад, наявності в середовищі молекул визначеного типу, величини рН, іонної сили чи окислювально-відновні властивості середовища [9-12]. По типу фізичного перетворювача сенсори можуть бути поділені на основні групи, що класифікуються відповідно до [13]: 1) електрохімічні, 2) масо-чутливі, 3) калориметричні, 4) акустичні, 5) оптичні. Тип перетворювача, що використовується, визначається особливістю реакцій і перетворень у хімічному чи біологічному чутливому шарі. Далі розглянемо детальніше сенсори з різними типами фізичних перетворювачів.

1.1. Електрохімічні сенсори

Електрохімічні сенсори призначені для якісного та кількісного аналізу перебігу хімічних або біологічних процесів, котрі супроводжуються окисно-відновними реакціями. Для аналізу цих процесів в реакторі чутливого елементу розташовують вимірювальні електроди з якими взаємодіють аналіти чи продукти їх взаємодії. Ця взаємодія призводить до змін електричних потенціалів на електродах або сили електричного струму, що пройшов через аналіт, та дозволяє робити кількісний аналіз досліджуваних аналітів. Реакції окислення і відновлення, котрі відбуваються на поверхні електродів, є основою для електронних обмінів між електролітом (зразок) і електродами. Типовий електрохімічний сенсор складається з трьох електродів, джерела постійної напруги та генератора-модулятора (Рис. 1.2). Система електродів утворена робочим електродом (WE), котрий є селективним до певного аналіту, на якому відбувається стандартна реакція окислення/відновлення, електродом порівняння (AE), відносно якого виконується вимірювання електричного сигналу, продукovanого реакцією, та протиелектрод (RE), котрий застосовується, щоб мінімізувати електричний струм котрий протікає через електрод порівняння, таким чином, зберігаючи стабільність його потенціалу під час роботи електролізера [14]. Електроди в

цих сенсорах переважно виготовляються з каталітичних металів, таких як платина або паладій, або вони можуть бути виготовлені з інших «не інертних» металів покритих вуглецем. В залежності від того, який електричний параметр аналізується на виході фізичного перетворювача, електрохімічні сенсори бувають потенціометричні (вимірюється напруга на шунті) чи амперметричні (вимірюється струм через електроди та аналіт).

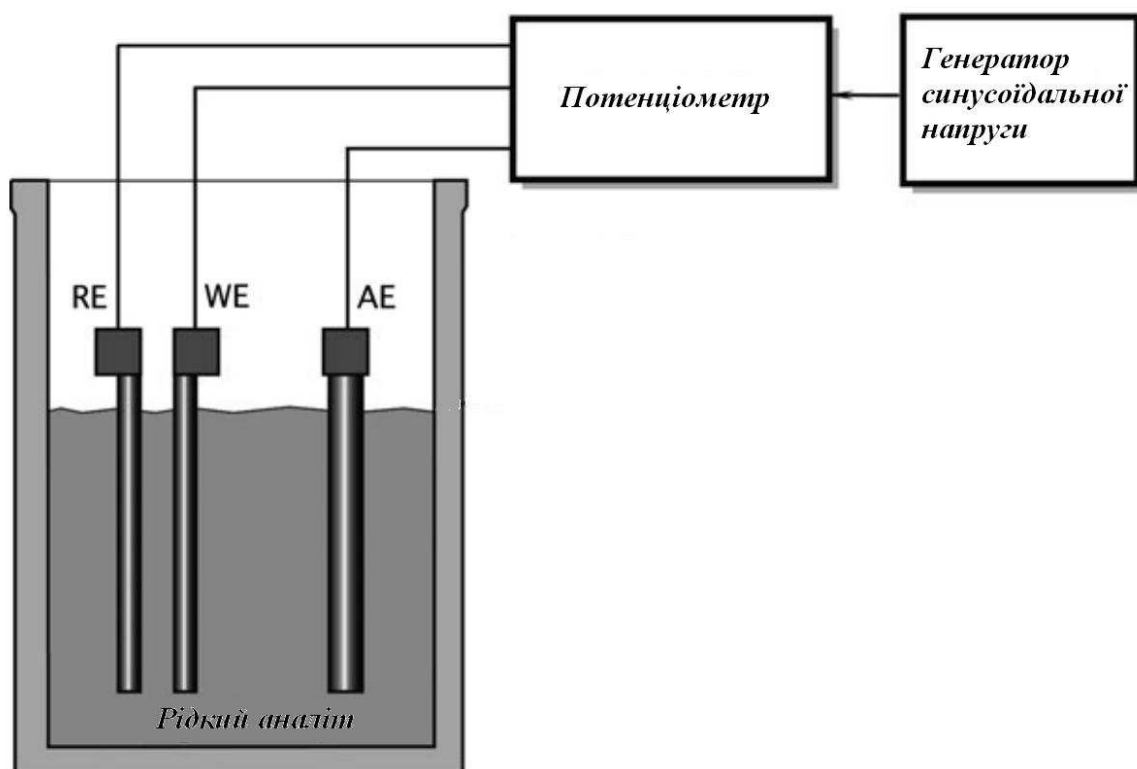


Рис. 1.2. Будова трьохелектродного електрохімічного сенсора [14].

У випадку досліджень біохімічних реакцій, котрі не потребують високої точності результату вимірювання, використовують двоелектродний електрохімічний сенсор в котрому відсутній протиелектрод. В цьому випадку вимірюють зміну електричної провідності досліджуваної речовини під час біохімічної реакції. Електрохімічний метод вимірювання за трьохелектродною схемою характеризується високою чутливістю та точністю, економічністю, простотою включення чутливих елементів, і

низькою споживаною потужністю [15, 16]. Тим не менш, незважаючи на те, що електрохімічна реакція не залежить від довжини оптичного шляху, що характерно для оптичних методів, на електроди виявлення сильно впливає зміна температури, кислотності рН та іонної концентрації, які обмежують термін придатності пристрою та вносять суттєві похибки у результат вимірювання.

1.2. Масочутливі сенсори

Масочутливий метод виявлення заснований на мікро- та нанометрових механічних системах, головним чином консолях, котрі називають кантілеверами. Консоль представляє собою механічну пружну систему типу балка, один кінець якої закріплений, а інший вільний і на ньому знаходиться реактор чутливого елементу. Довжина цих консолей переважно знаходиться в діапазоні 100-200 мкм, з товщиною від 0,3 до 1 мкм та визначається розмірами аналітів та вимогами до роздільної здатності вимірювального приладу в цілому. Консольні пристрої на основі кантілеверів можуть бути реалізовані з різними формами і розмірами з використанням традиційних способів фотолітографії або мікрообробки поверхні.

Спочатку масочутливі сенсори використовувались для поверхневої зондової мікроскопії (ПЗМ) [17] та атомно-силової мікроскопії (Рис.1.3) для дослідження топології поверхонь з нанорозмірною шорсткістю, а згодом були адаптовані для виявлення хімікатів [18, 19] і біологічних матеріалів [20, 21]. Консольна технологія показала свою актуальність застосування для виявлення біомолекул [22]. Була показана можливість їх застосування для виявлення широкого спектра хімічних речовин та газів, таких як водень [19], від парів розчинників [23] до газоподібних вибухових речовин [24]. Принцип роботи масочутливого сенсора заснований на вимірюванні прогину консолі внаслідок збільшення маси аналіту, котрий приєднався до рецепторної поверхні реактора чутливого елементу (Рис.1.4). Такі сенсори мають два

фізичних перетворювача: першим є консоль, котра виконує перетворення «маса-механічні напруження», а другим перетворювач «механічні напруження-електричний сигнал».

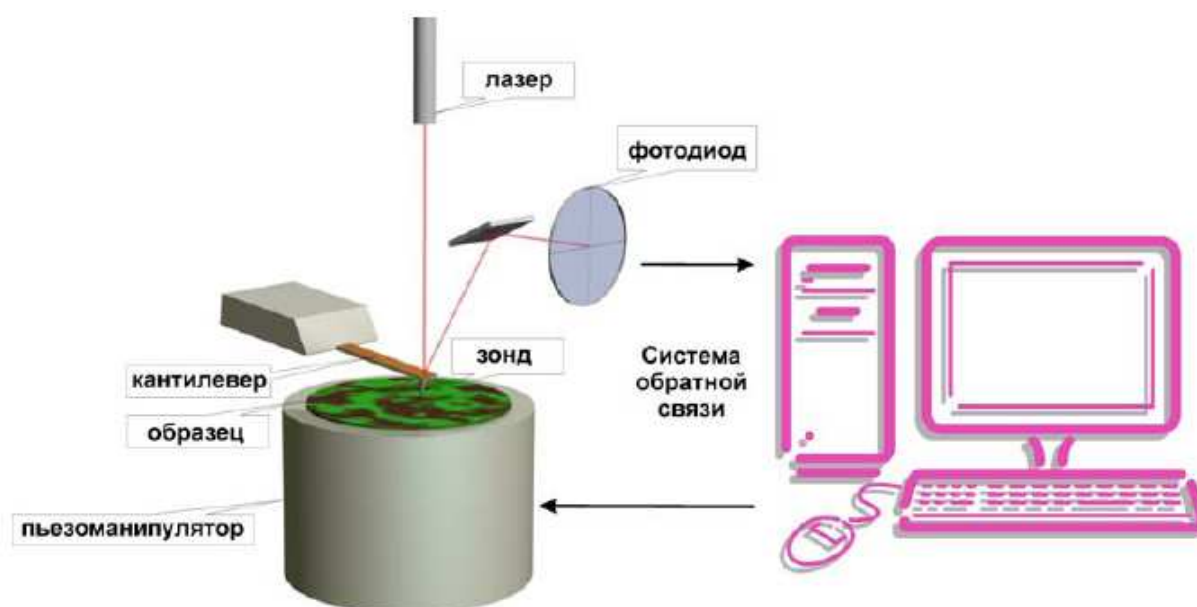


Рис. 1.3. Схема атомно-силового мікроскопа [25].

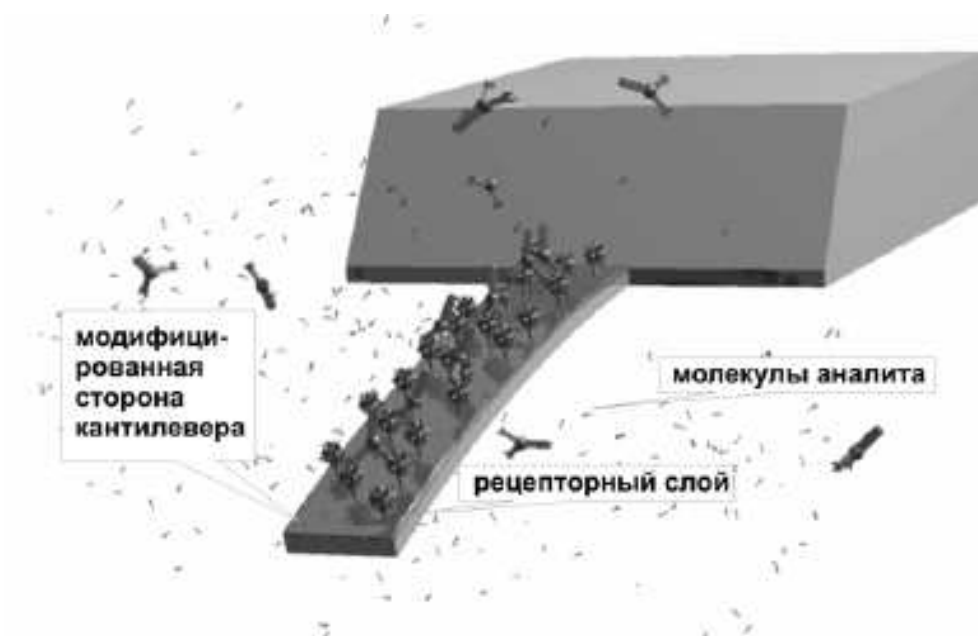


Рис. 1.4. Мікрокантилевер з осадженим рецепторним шаром [25].

Консольні пристрої зазвичай працюють у двох різних режимах вимірювання: (I) статичного прогину, де зв'язування аналіту з одного боку кантілевера викликає незбалансовану поверхневу напругу; (II) динамічному (резонансному) режимі, в якому приєднання аналіту до кантілевера викликає зміну його маси i , отже, зрушує резонансну частоту його коливань. Резонансна частота кантілевера залежить як від матеріалу, з якого він зроблений, так і від його габаритних розмірів та маси. Матеріал кантілевера визначає його пружність i , таким чином, змінюючи матеріал, можна варіювати жорсткість кантілевера при незмінних габаритах його конструкції. Вибір резонансної частоти i матеріалу кантілевера визначається особливостями поверхні котру необхідно досліджувати. Так, якщо поверхня має періодичну структуру з періодом меншим за 1 нм, то використовують високочастотні кантілевери.

В першому режимі другим перетворювачем є п'єзоелемент який продукує електричний заряд пропорційний механічним напруженням (Рис.1.5) [26].

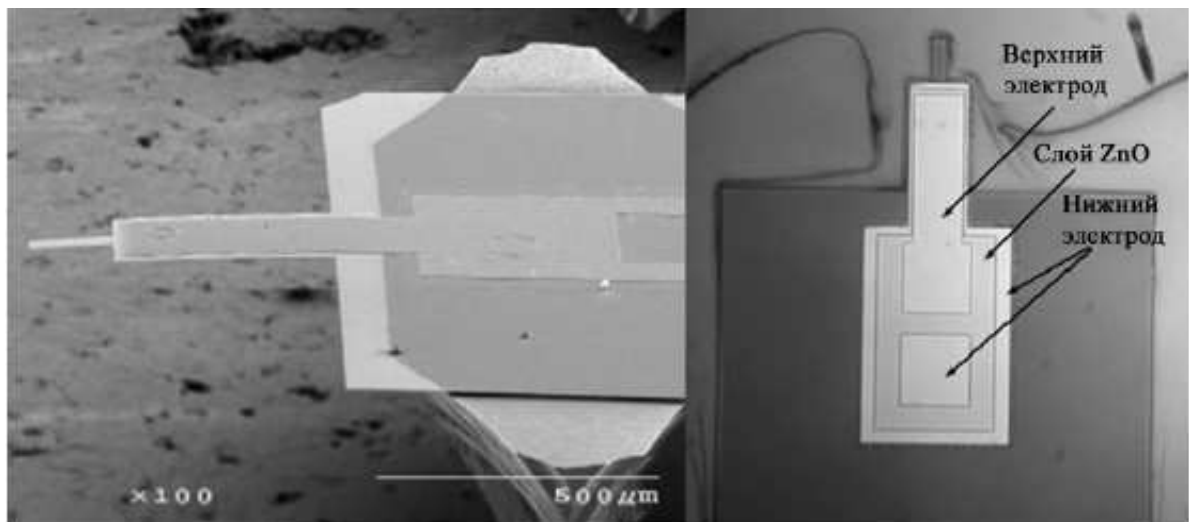


Рис.1.5. Мікрофотографія мікромантілевера з вторинним фізичним перетворювачем на п'єзоефекті [26].

Також зміни в поверхневій напрузі, котрі призводять до вигину кантілевера, можуть бути визначені за допомогою оптичних методів

заснованих на вимірюванні відхилення лазерного променя сфокусованого на вільному кінці кантилевера (Рис. 1.6). В другому режимі кантилевер коливається з резонансною частотою під дією зовнішнього збудження. Для приведення в коливальний рух кантилеверів та вимірювання резонансної частоти використовують різноманітні методи збудження, у тому числі механічні, оптичні, електростатичні і електромагнітні. Згодом оптичний метод реєстрації зміни положення та збудження коливань кантилевера був замінений на теплові [27], ємнісні [28], і п'єзорезистивні [29] методи вимірювання, тим самим усуваючи необхідність використання лазерів і оптики, що дозволило спростити будову сенсора та зменшити його габарити.

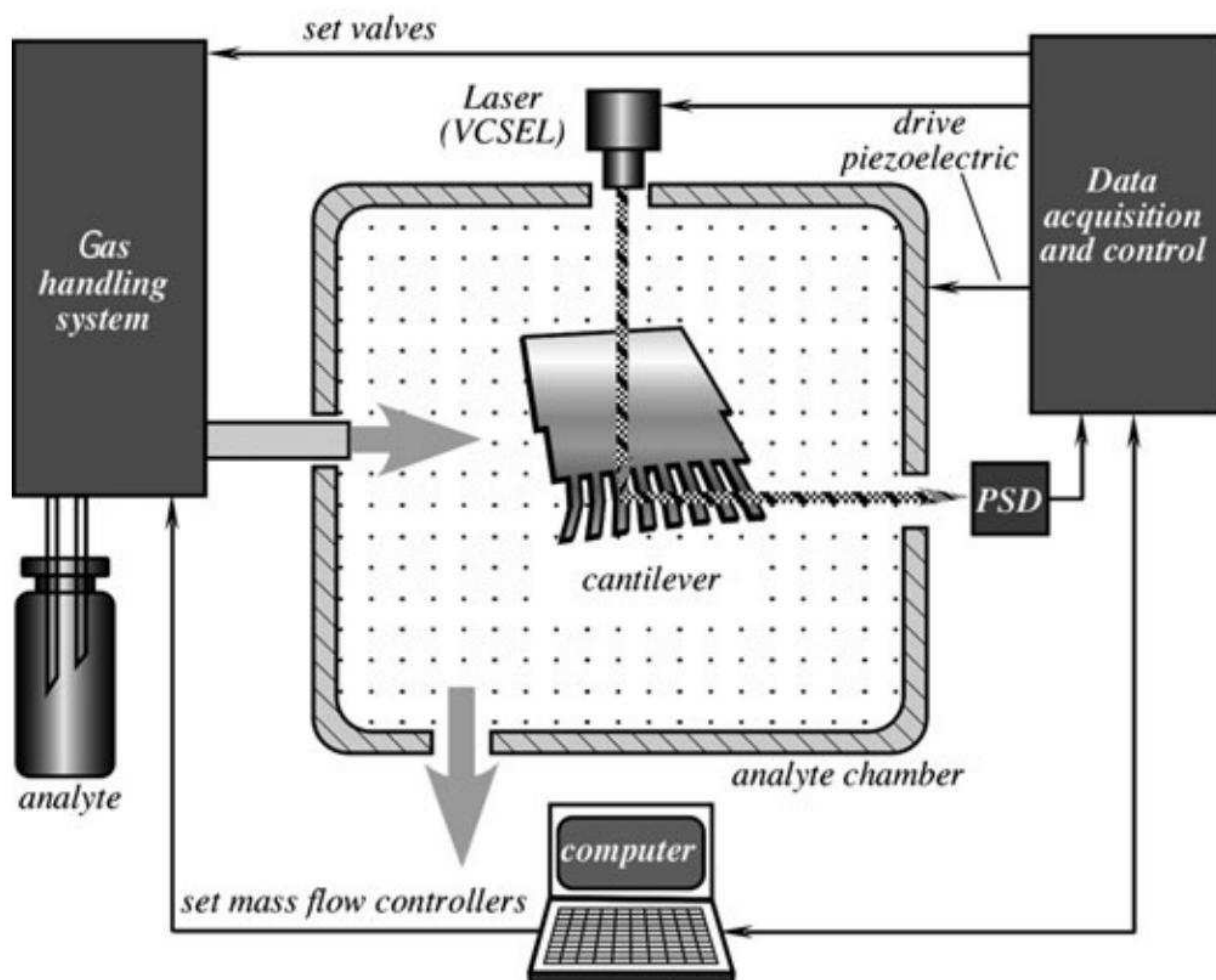


Рис. 1.6. Схема вимірювання відхилення лазерного променя сфокусованого на вільному кінці кантилевера [14].

Другий режим дозволяє досягти більшої чутливості і точності внаслідок менших механічних втрат та інерційності, ніж в першому режимі.

Недоліками таких фізичних перетворювачів є висока межа детектування за рахунок механічних втрат. Крім того консольні системи дуже чутливі до зовнішніх впливів таких як вібрації та зміна температури, що вносить значні похибки в результат вимірювання. Для їх усунення застосовують такі спеціальні заходи, як механічне та теплове екранування, демфрування та ін., що суттєво підвищує вартість та масо-габаритні параметри вимірювальної системи.

1.3. Калориметричні сенсори

Калориметричні сенсори перетворюють тепло на електричну напругу. Зазвичай цей процес дво- або тристадійний. Спочатку взаємодія рецептора з аналітом продукують певну кількість теплоти ΔQ , яка потім перетворюється на різницю температур ΔT . Після цього різниця температур трансформується у фізичному перетворювачі на різницю потенціалів ΔU . Найпростіший приклад такого перетворювача – термопара, котра представляє собою два дроти виготовлені з різних металів, які спаяно в одному кінці й розімкнено в другому. Різниця потенціалів виникає на розімкнених кінцях, якщо є різниця температур між спаяними та розімкненими кінцями дротів. Рецепторний шар, з яким взаємодіє аналіт, наноситься на гарячий спаяний кінець термопари; холодний кінець залишається відкритим. Різниця потенціалів між гарячим і холодним кінцями базується на ефекті Зеебека (1.1).

$$\Delta U = \alpha_S \Delta T \quad (1.1)$$

Де, α_S – коефіцієнт Зеебека, В/К;

ΔT – різниця температур, К;

ΔU – різниця потенціалів, В.

Коефіцієнт Зеебека є постійною величиною для відповідного матеріалу. Для отримання максимальної різниці потенціалів на кінцях термопари ΔU необхідно використовувати метали з максимальною різницею значень α_S .

Для підвищення ефективності сенсору замість контакту метал-метал використовують контакт метал-напівпровідник, оскільки α_s у металів на два порядки менше, ніж у напівпровідників. Так, для кремнію при кімнатній температурі коефіцієнт Зеебека має значення α_s 0,3–5 мВ/К. Оскільки α_s у металах на два порядки менше, ніж у кремнію, то впливом ефекту Зеебека на будь-яких металевих з'єднаннях у сенсорі можна знехтувати в порівнянні з ефектом на контакті метал – кремній. Для підвищення чутливості сенсора смужки термопар з'єднують у серію в кількості N штук, тоді чутливість сенсора буде пропорційна добутку $\alpha_s \cdot N$. Тепло, яке виділяється при адсорбції/десорбції аналіту, призводить до виникнення імпульсу термонапруги відповідного знаку.

Чутливість сенсору можна підвищити, якщо використовувати замість кремнієвих термопар діод з джерелом струму чи біполярну транзисторну структуру [30] (Рис.1.7). Якщо маємо кремнієвий біполярний транзистор, який підключено за схемою із загальною базою (рис. 1.7.,б) і постійним колекторним струмом, то напруга база – емітер V_{BE} зменшуватиметься майже лінійно зі зростанням температури T , тобто $V_{BE} = V_{BE0} - \lambda \cdot T$ (λ – константа, яка залежить від густини струму).

На практиці використовують температурні сенсори на основі кремнієвих інтегральних схем (ІС), які поєднують на одному кристалі електронний підсилювач, систему зміщення за напругою, лінеаризацію та аналого-цифровий перетворювач. Серед них найбільш відомим ІС температурним сенсором є так званий диф-сенсор, який генерує вихідний струм або напругу, що пропорційні абсолютній температурі.

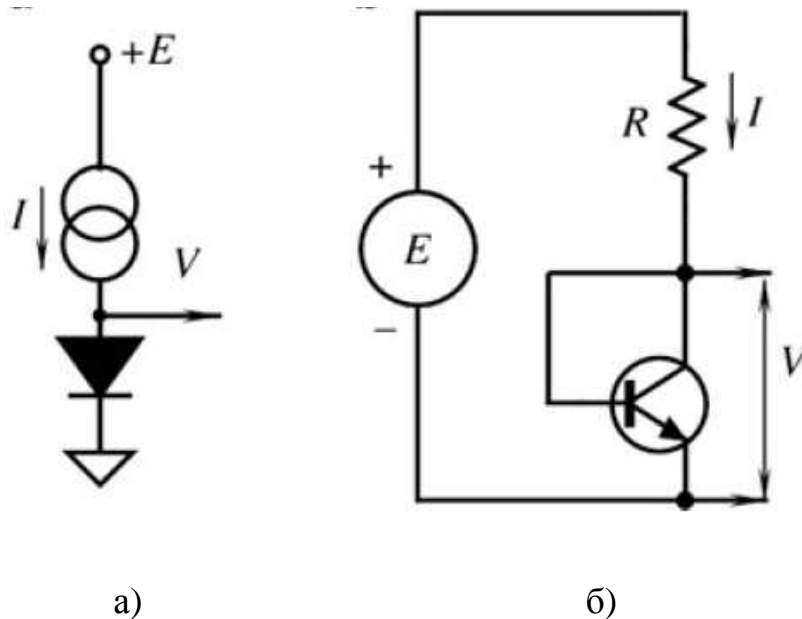


Рис. 1.7. Калориметричний сенсор на базі напівпровідникового діоду з джерелом струму (а) та на біполярній транзисторній структурі (б) [14].

Базовим сигналом диф-сенсора є різниця між напругами база-емітер двох транзисторів ΔV_{BE} , які працюють при постійному значенні відношень їх емітерних струмів [31]. Коли обидва транзистори мають однакову температуру T , то рівняння різниці напруг на їх базових переходах виражається формулою (1.2) і залежить від площ емітерних переходів A_e , рухливості носіїв J_s та струму через колекторні переходи I_c .

$$\Delta V_{BE} = \frac{kT}{e} \ln(pr) \quad (1.2)$$

Де, k – стала Больцмана;

T – температура р-п переходу транзистора, К;

e – елементарний електричний заряд (електрона), Кл;

r – відношення площ р-п переходів база-емітер, $r = A_{e2}/A_{e1}$;

p – відношення колекторних струмів, $p = I_{c1}/I_{c2}$.

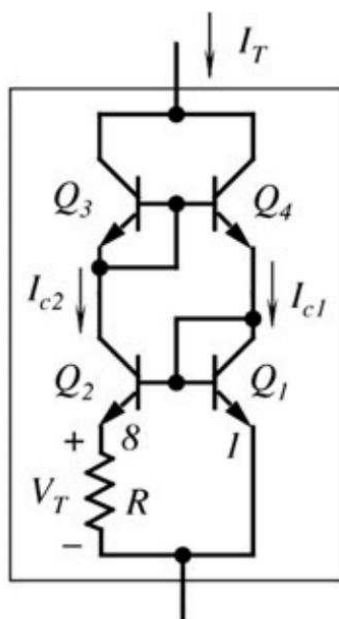
Для ідентичних транзисторів на одній кремнієвій підкладці виконується умова $J_{s2} = J_{s1}$. Коли відношення площ р-п переходів база-емітер r і

відношення колекторних струмів \mathbf{p} є сталими величинами, то різниця потенціалів на переході база-емітер визначається за формулою (1.3).

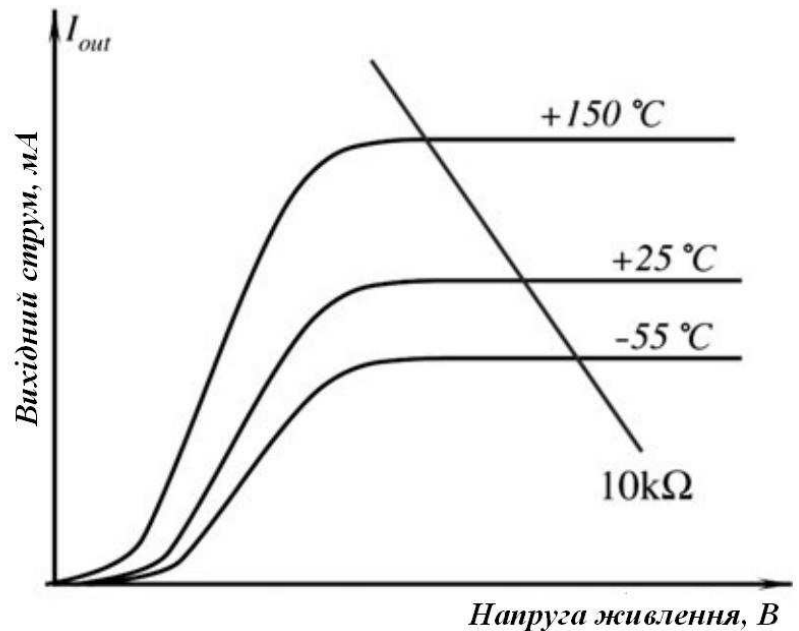
$$\Delta V_{BE} = V_{BE1} - V_{BE2} = \frac{kT}{e} \ln \frac{I_{c1} A_{g2} J_{S2}}{I_{c2} A_{g1} J_{S1}} \quad (1.3)$$

Різниця потенціалів ΔV_{BE} пропорційна абсолютній температурі диф-сенсору.

Диференційний калориметричний (ДК) сенсор з джерелом струму складається з транзисторів Q1 та Q2 котрі забезпечують необхідну величину \mathbf{r} та транзисторів Q3 та Q4, які створюють так зване струмове "дзеркало" з величиною відношення струмів \mathbf{p} (Рис.1.8, а). ДК сенсор забезпечує температурну зміну вихідного струму 1 мкА/К, котрий стабілізований щодо зміни напруги живлення та залежить лише від зміни температури (Рис.1.8, б).



а)



б)

Рис. 1.8. Схема електрична принципова диференційного калориметричного сенсору (а) та його вихідні характеристики (б) [14].

Недоліком як транзисторної біполярної структури, так і ДК сенсора є те, що при звичайних температурах має місце значний початковий сигнал "зсуву" на виході сенсора. Оскільки при хімічній адсорбції температурна зміна незначна, необхідно мати фізичний перетворювач з нульовим початковим значенням вихідного сигналу до адсорбції. Сигнал, який пропорційний температурі в $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ можна отримати за допомогою вимірювальної системи зі зворотнім зв'язком по температурі (рис. 1.9).

ДК сенсор виконаний у вигляді операційного підсилювача і має додаткове джерело напруги порівняння на прецизійному термодатчику. Додаткове джерело напруги (LM35DZ) генерує напругу пропорційну температурі в термостаті (thermal equalizer) де знаходиться холодний кінець термопар. Таке технічне рішення забезпечує зменшення похибки визначення температури досліджуваного середовища та додатково зменшує флуктуаційні шуми у вимірюваному сигналі. Необхідно також забезпечити стабільне живлення всієї електричної схеми ДК сенсора.

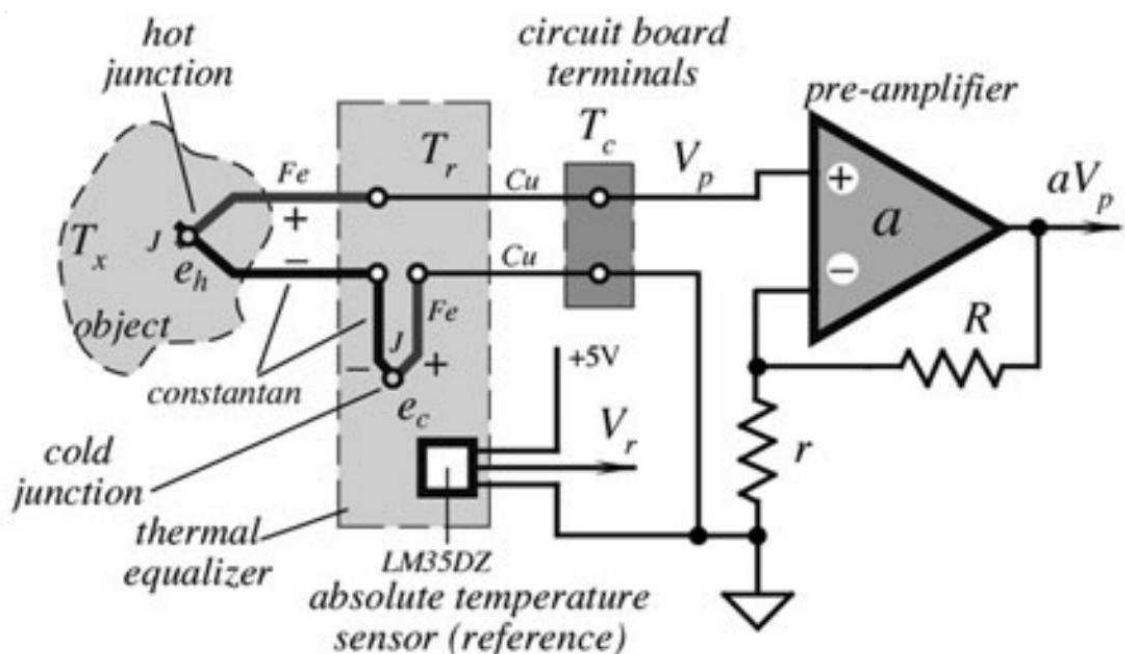


Рис. 1.9. Структурна схема вимірювальної калориметричної установки з ДК сенсором виконаним на операційному підсилювачі [14].

Серед недоліків такого типу сенсорів також треба відзначити необхідність температурної стабілізації, оскільки зміна температури навколишнього середовища спотворює вихідні параметри сенсора. Для усунення цього недоліку застосовують складні мембранні структури та диференціальні пари детекторів. Другою проблемою є необхідність уникати інтерференції ефектів, котрі виникають при одночасній адсорбції кількох газів, коли можуть відбуватись складні хімічні реакції як з поглинанням, так і з вивільненням теплової енергії, в той час як детектор буде вимірювати тільки результуючу теплову дію.

1.4. Оптичні сенсори

Оптичні сенсори мають ряд переваг перед електрохімічними та механічними методами. Основною їх перевагою є висока швидкодія, точність вимірювання параметрів аналіту, висока чутливість та широкий діапазон застосування [32]. Недоліком є висока вартість вимірювального обладнання. Найбільш широко використовувані оптичні методи: абсорбція, флюоресценція, хемілюмінесценція та поверхневий плазмонний резонанс (ППР).

1.4.1. Флуоресцентні сенсори

Флуоресцентні сенсори використовують явище флуоресценції, котре полягає в емісії вторинних фотонів продуктами реакції взаємодії аналіту з рецептором під впливом збуджуючого випромінювання. Флуоресценція є результатом процесу переходу електронів у збуджений стан, що відбувається в деяких молекулах, котрі отримали назву флуорофорів або флуоресцентних барвників. Тривалість флуоресценції залежить від тривалості життя електронів у збудженому стані. Флуоресцентний барвник має молекулу, білок, або квантову точку, яка може маркувати досліджувані аналіти як білки, нуклеїнові кислоти, ліпіди, тощо. Наявність високочутливих з високою

вибірковістю люмінесцентних методів маркування робить флуоресценцію оптичним методом молекулярного зондування в мікромініатюрних вимірювальних системах, котрий широко використовується. Флуоресцентний сенсор має наступні складові елементи: джерело збуджуючого випромінювання; флуорофор; фільтри на довжину хвилі випромінювання вторинних фотонів, щоб ізолювати їх від фотонів збудження; фотодетектор, котрий реєструє вторинні фотони і виробляє відповідний електричний сигнал, пропорційний інтенсивності емісії вторинних фотонів.

Для збільшення чутливості вимірювання та зниження межі детектування сенсор роблять з двома вимірювальними оптичними каналами: опорним і реєструючим (рис.1.10).

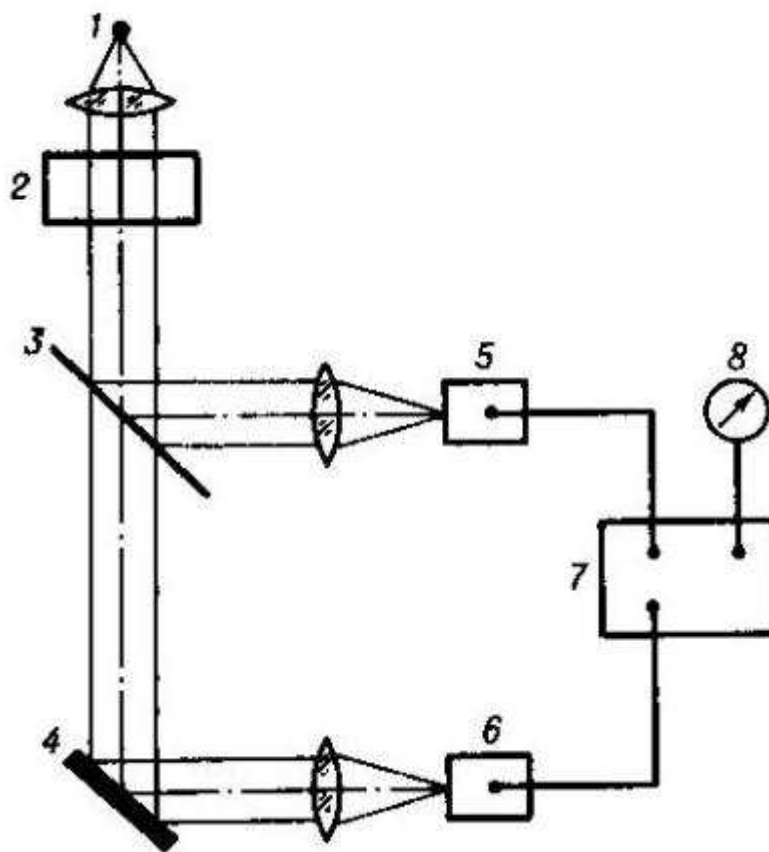


Рис. 1.10. Структурна схема двохканального флуорометра [33].

Від джерела збуджуючого випромінювання 1 світло через модулятор інтенсивності 2 падає на поділяючу пластинку 3, котра розділяє оптичний

сигнал на дві рівні складові: одна йде на фотодетектор опорного каналу 5, а друга складова, відбившись від досліджуваного зразку 4, йде на фотодетектор реєструючого каналу 6. Сигнали порівнюються в компараторі 7, різниця опорного та реєструючого сигналів змінює стан індикатора 8. Інформативним сигналом є або відношення амплітуд інтенсивностей цих складових, або фазовий зсув між ними. Величина фазового зсуву φ (1.4) та відношення амплітуд опорного і реєструючого сигналів (1.5) A_0/A залежить як від довжини хвилі (частоти коливань ω) збуджуючого випромінювання, так і від затримки в часі τ між фазою флуоресценції і фазою збуджуючого випромінювання [33].

$$\varphi = \arctg (\omega \cdot \tau) \quad (1.4)$$

$$A_0 = A \sqrt{1 + \omega^2 \cdot \tau^2} \quad (1.5)$$

Незважаючи на широке коло застосування флуоресцентних сенсорів основним їх недоліком є неможливість вимірювати низькорівневі сигнали.

1.4.2. Хемілюменісцентні сенсори

Хемілюмінесценція також є перспективним оптичним методом для виявлення аналіту, в якому джерелом вторинних фотонів є безпосередньо фотохімічна реакція, або реакція ферментної мітки індукована за допомогою хімічної реакції. Перевага цього методу в тому, що не потрібно використовувати ні джерело збудження вторинних фотонів, ні фільтри вторинних фотонів, що суттєво зменшує складові інструментальної похибки вимірювання значення інтенсивності випромінювання вторинних фотонів. Спосіб детектування хімічних та біологічних реакцій такими сенсорами не вимагає складного інструментарію, що значно знижує масу, габарити і підвищує транспортабельність аналітичних приладів. Хоча хемілюмінесценція пропонує простий метод виявлення для загального застосування LOC, тим не менш, особливістю таких приладів є необхідність

використання в сенсорах високочутливих фотодетекторів з низьким рівнем власних шумів [34], що значно підвищує вартість не тільки сенсорів, але й усього вимірювального обладнання.

1.4.3. Абсорбційні сенсори

Абсорбційні сенсори використовують методи вимірювання оптичної щільності, котрі передбачають визначення концентрації аналіту шляхом вимірювання ослаблення інтенсивності світла певної довжини хвилі, що пройшло через аналіт. У лабораторії ослаблення світла зазвичай вимірюється за допомогою УФ-спектроскопії. УФ поглинання вперше було використано Густафссоном [35]. Основним недоліком методів виявлення поглинання на основі мікрофлюїдики, є те, що при зменшенні об'ємів зразків, довжина оптичного шляху через зразок зменшується, а це знижує чутливість, відповідно до закону Ламберта. Тому основним недоліком адсорбційних сенсорів є великі габарити та вузький спектральний діапазон вимірювання.

1.4.4. Сенсори на поверхневому плазмонному резонансі

Поверхневий плазмонний резонанс - це явище порушення умови повного внутрішнього відбиття (ПВВ) на межі поділу двох середовищ: більш оптично щільного та менш оптично щільного. Під час виникнення ППР значна частина енергії падаючого світла на поверхню металевої плівки чутливого елементу ППР-сенсору (ЧЕ) перетворюється в енергію плазмонів, внаслідок чого інтенсивність відбитого від її поверхні світла різко спадає. При цьому електричне поле цієї хвилі спадає за експонентою у напрямку, котрий перпендикулярний межі поділу.

Метод вимірювання на основі ППР є найбільш ефективним, оскільки не потребує використання міток та видає результат в реальному часі [36].

Подібно до більшості різноманітних сенсорів, біосенсори складаються з власне чутливого біологічного чи хімічного елементу, або первинного

перетворювача, та сполученого з ним фізичного перетворювача. Останній призначений для формування вихідного сигналу, який відображає реакцію чутливого елемента на присутність відповідного аналіту. Аналітичні системи, які використовують явище ППР для реалізації функції такого перетворювача, знайшли в останній час широке застосування при дослідженні високоспецифічних біомолекулярних реакцій («біорозпізнавання»), до яких належать реакції антиген-антитіло, фермент-субстрат, рецептор-ліганд (роль ліганда можуть відігравати молекули гормонів, нейромедіаторів, ферментів), а також взаємодії молекул фармакологічних препаратів або токсинів з відповідними мішенями.

Найбільш розповсюджена оптична конфігурація, яка застосовується у біосенсорах на основі ППР, схематично показана на Рис.1.11.

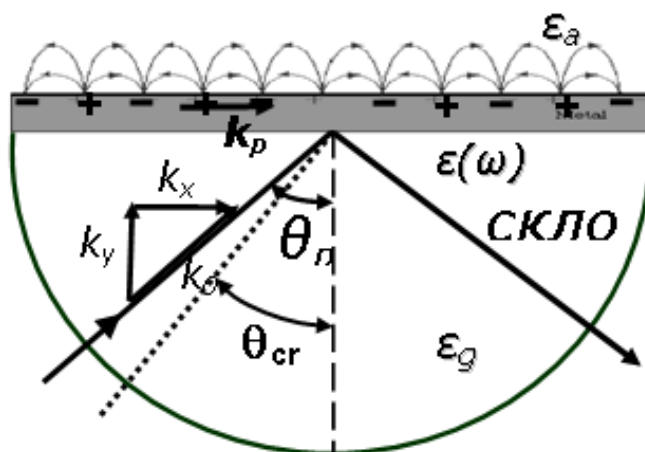


Рис. 1.11. Схема збудження поверхневого плазмонного резонансу в геометрії Кретчмана [37].

Вона складається з призми повного внутрішнього відбиття з нанесеною на робочу поверхню тонкою (~50 нм) плівкою золота. У цій системі, яка дістала назву конфігурації Кретчмана, електромагнітне випромінювання, спрямоване на робочу поверхню під певним кутом θ так, як показано на схемі, і поляризоване у площині падіння (р-поляризоване), викликає збудження поверхневих плазмових хвиль.

Експериментально вимірюється кутова залежність коефіцієнту відбиття, на якій куту θ_r , який називають резонансним кутом, відповідає зменшення інтенсивності відбитого поверхнею світла (при оптимальній товщині металевої плівки – практично до нульового значення). Конкретне значення резонансного кута залежить від показників заломлення призми та зовнішнього середовища, а також від наявності на поверхні металу покриття, показник заломлення n_s якого відрізняється від показника заломлення зовнішнього середовища. При збільшенні n_s та/або товщини цього покриття значення резонансного кута зростає, при цьому він за будь-яких умов повинен перевищувати кут повного внутрішнього відбиття у даній системі.

Для створення біосенсору на основі такої конфігурації на поверхні металевої плівки формується шар біочутливих молекул (антитіл, антигенів, ферментів тощо), імобілізованих (нанесених) хімічним шляхом за допомогою добре розроблених на сьогодні технологій. Робоча поверхня призми приводиться у контакт із пробою, якою може бути, наприклад, певна біологічна рідина. Якщо вона містить молекули, здатні селективно зв'язуватися з імобілізованим біочутливим шаром, відбувається ефективне збільшення товщини молекулярного покриття на поверхні плівки золота. В експерименті це викликає зсув мінімуму кутової залежності відбиття у вимірювальній системі у бік зростання кутів (цю залежність у літературі, присвяченій поверхневому плазмонному резонансу, часто називають резонансною кривою). Розрізняють дві великі групи рецепторів: на основі ферментів і на основі антитіл. ППР сенсори з біорецептором на основі антитіл називають ще «ППР іммуносенсором».

Рецептор - це шар органічних молекул, які вибірково взаємодіють з аналітом – молекулами (частинками), концентрацію котрих в розчині треба виміряти. На рис.1.12. показана схема спостереження зсуву кривої ППР при наявності аналіта [38]. Світло проходячи через прозоре середовище 1 з високим показником заломлення падає на тонку металеву плівку 2, на яку

нанесений чутливий шар ліганду 3. З лігандом взаємодіють молекули аналіту 4.

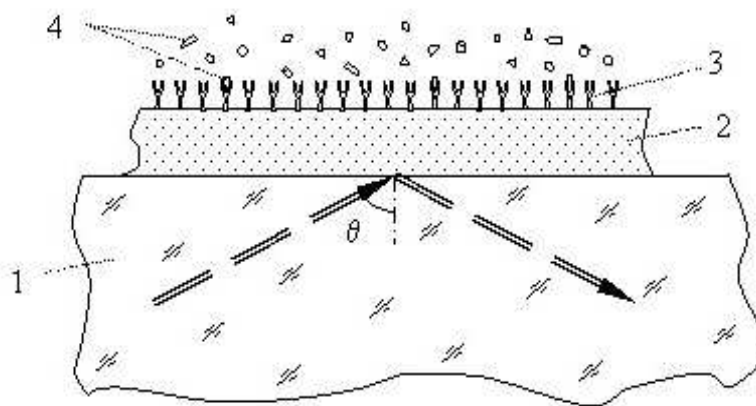


Рис. 1.12. Схема спостереження характеристик ППР при наявності рецептору на поверхні чутливого елемента ППР-приладу [38].

Коли молекули (частинки) аналіту приєднуються до молекул ліганду (рецептора), створюване лігандом електричне поле на поверхні металу змінюється, внаслідок чого резонансний мінімум ППР зміщується (Рис.1.13).

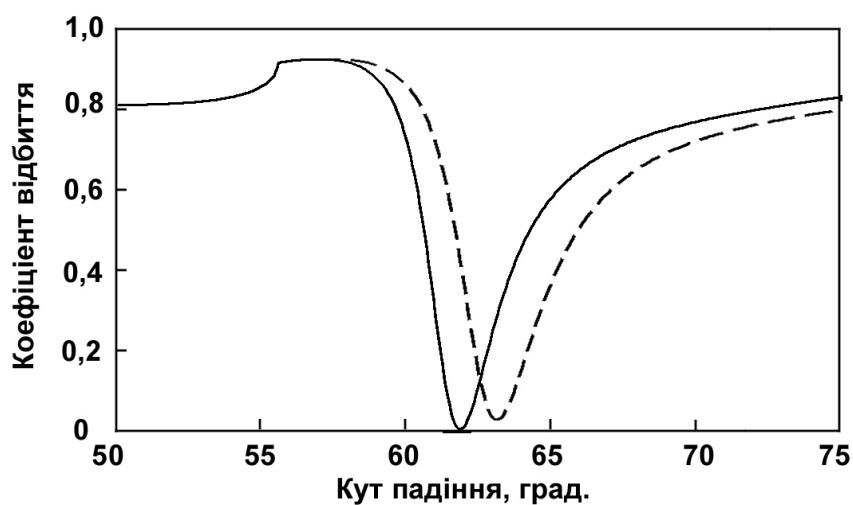


Рис. 1.13. Резонансні криві, отримані за допомогою сенсора на основі ППР.

Зсув цей тим більше, чим більше молекул (частинок) аналіта приєдналися до ліганду, що залежить від концентрації аналіта в досліджуваному розчині і від кінетики процесів біохімічної взаємодії аналіта з лігандом [39, 40].

Типова технологія застосування можлива як для біологічних сенсорів так і для хімічних. Різниця в тому, що для хімічних сенсорів не використовують ліганд. В цьому випадку вимірюють зміну показника заломлення шляхом послідовного заміщення над плазмонносійним металевим шаром (ПНШ) буфера і досліджуваного розчину хімічної речовини чи газу. Буферний розчин чи буферний газ використовують для очищення ПНШ. Буфери використовують і для біологічних сенсорів.

Розглянемо типову технологію застосування ППР для біологічного сенсору [38]. На чутливу поверхню ППР сенсору встановлюють спеціальну протічну чарунку (flow cell), котра через патрубки приєднується до системи регулювання потоку досліджуваної рідини з використанням перистальтичного насоса й ін'єкційного клапану. Оскільки протічна чарунка і патрубки дуже тонкі (для економії коштів), усі рідини пропускають через 0,2 мкм фільтр і ретельно дегазують. Під час вимірювань протічна чарунка й чутлива поверхня спочатку промиваються декілька хвилин буферним розчином (рис. 1.14, фаза I).

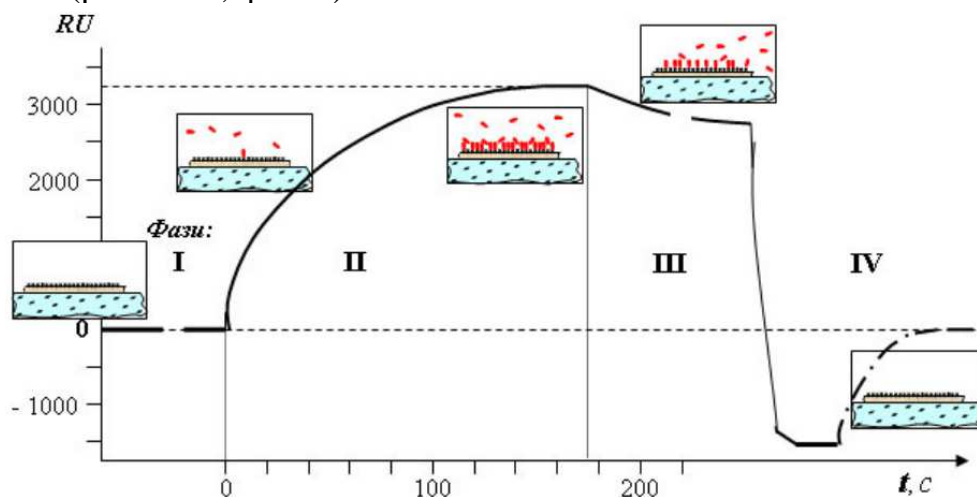


Рис. 1.14. Часова залежність (кінетика) зсуву резонансу ППР

Під час біохімічних досліджень зазвичай виконують підготовчий цикл. В цьому циклі через протічну чарунку прокачують спочатку розчин протеїну, котрий осідає мономолекулярним шаром на поверхні золотої плівки. Потім

прокачують розчин тих біохімічних молекул або антитіл, взаємодію котрих з молекулами або частинками аналіту потрібно вивчити. Вони приєднуються до протеїну і утворюють біорецепторний шар (ліганд). Ця процедура може тривати 1..2 години. Для хімічних сенсорів ця процедура не потрібна.

Потім через чарунку прокачують заданий об'єм рідини з досліджуваним аналітом, і починається вимірювання (фаза II).

Частинки аналіту приєднуються до ліганду не одразу. Тому криву ППР треба вимірювати багаторазово, кожен раз розраховуючи за результатом вимірювання точне положення мінімуму ППР, і будувати графік його залежності від часу. Цей графік називається «сенсограмою» або «кінетикою». Всім автоматично керує мікропроцесор.

В ході наступної фази (III) інжекція аналіту припиняється, але продовжується прокачування чистої рідини. Процеси приєднання практично припиняються, йдуть лише процеси дисоціації. Хід кривої на цій стадії дозволяє обчислити константи дисоціації, знаючи які можна по результатах II фази розрахувати константи реакції приєднання. Під час фази IV через чарунку прокачують розчин елюента, рідини, яка різко послаблює хімічний зв'язок між аналітом і лігандом. Елюент вимиває аналіт, практично не впливаючи на ліганд.

Далі йде регенерація біочутливої поверхні, під час якої положення мінімуму ППР повинно повернутись у початкове положення. Після чого можна починати новий цикл вимірювань хімічної взаємодії ліганду з іншим або з тим самим аналітом, але при інших умовах. Так можна провести понад 50 різних досліджень з одним і тим самим лігандом.

Кінетика збільшення зсуву мінімуму ППР відображає кінетику хімічних реакцій приєднання аналіта до ліганду. Стаціонарний стан є результатом динамічної рівноваги між хімічними процесами приєднання і дисоціації аналіту і залежить як від констант відповідних реакцій, так і від концентрації

аналіту, температури розчину, умов перемішування й інших факторів, які можна дослідити.

Отже, за рахунок вимірювання величини зсуву мінімуму характеристики відбиття і залежності її кутового положення від часу можливо:

1. Визначати наявність в розчинах хімічних, біохімічних речовин і мікрочастинок (вірусів, бактерій, антитіл, токсинів,...);
2. Визначати концентрацію в розчинах хімічних, біохімічних речовин і мікрочастинок (вірусів, бактерій, антитіл, токсинів...);
3. Вивчати кінетику біохімічних взаємодій і її залежність від різних чинників.

Таким чином ППР сенсори можна використовувати для наукових досліджень в біохімії, для визначення небезпечних забруднень, отруйних і шкідливих домішок в питній воді, для контролю різних інгредієнтів в молоці, пиві, вині, інших напоях, в бензині, моторних маслах і т.п. З'явилась можливість швидко визначати шкідливі віруси, бактерії, токсини, генетично модифіковані організми, біохімічні речовини в рідинах, як в лабораторних, так і в польових умовах [41, 42].

Аналіз існуючих найбільш розповсюджених типів сенсорів показав, що найбільш перспективним напрямом розвитку аналітичного приладобудування є вдосконалення існуючих та створення нових приладів на явищі ППР оскільки саме метод ППР дозволяє отримати найменшу межу детектування (на 2 порядки нижче, ніж для інших оптичних сенсорів та при задовільній точності яка становить $\pm 2 \cdot 10^{-6}$) при вимірюванні оптичного показника заломлення досліджуваних речовин.

РОЗДІЛ 2

ФІЗИЧНІ ОСНОВИ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

2.1. Взаємодія електромагнітного поля з металом

Механізм реакції вільних електронів в металі на зовнішнє електричне поле та фізичну природу діелектричної сталої металу може бути описано рівняннями Максвелла. Зв'язок між векторами електричної та магнітної індукції та векторами напруженості відповідних полів виражається співвідношеннями, які враховують реакцію середовища (2.1, 2.2).

$$\mathbf{D} = \epsilon \epsilon_0 \mathbf{E} = \epsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad (2.1)$$

$$\mathbf{B} = \mu \mu_0 \mathbf{H} \quad (2.2)$$

Де, \mathbf{D} – вектор електричного зміщення, Кл/м²;

\mathbf{E} – вектор напруженості електричного поля, В/м;

\mathbf{B} – вектор індукції магнітного поля, Тл;

\mathbf{H} – вектор напруженості магнітного поля, А/м;

\mathbf{P} – вектор поляризації середовища, який визначається як добуток густини електричного заряду на величину його зсуву: $\mathbf{P} = \rho \cdot \mathbf{x}$;

ϵ_0 – діелектрична проникність вакууму, Ф/м;

μ_0 – магнітна проникність вакууму, Гн/м;

ϵ, μ – відносні діелектрична та магнітна проникності, відповідно.

Для оцінки характеру реакції електронного газу на дію електромагнітних хвиль видимого діапазону необхідно скористатись елементарною теорією електропровідності [1-3]. Ймовірність того, що електрон у металі матиме енергію E , описується розподілом Фермі (2.3).

$$w(E) = \frac{1}{e^{(E - E_F)/kT} + 1}, \quad (2.3)$$

З розподілу Фермі встановлено, що електрони заповнюють стани з енергією нижче енергії Фермі E_F , які для s-металів лежать всередині сфери у k -

просторі (сфери Фермі). Під дією електричного поля електрони набувають додаткової енергії, а в результаті розсіювання на фононах та дефектах кристалічної ґратки металу втрачають її. В результаті це призводить до зміщення сфери Фермі на величину Δk , яка визначається виразом (2.4).

$$\Delta k = -\frac{eE}{\hbar} \tau \quad (2.4)$$

З виразу (2.4) можна визначити, що додаткова середня швидкість електронів Δv , яку електрони набувають під дією електричного поля (дрейфова швидкість) визначається ефективною масою електрона та напруженістю електричного поля (2.5).

$$\Delta v = -\frac{eE}{m^*} \tau \quad (2.5)$$

Де, Δv – додаткова середня швидкість електронів, м/с;

e – елементарний електричний заряд, $e = 1,60218 \cdot 10^{-19}$ Кл;

m^* - ефективна маса електрона у металі, кг;

τ - середній час між актами розсіювання, с;

\hbar – стала Планка, $\hbar = 1,0546 \cdot 10^{-34}$ Дж·с.

Тоді, оскільки густина струму $j = \sigma \cdot E$, питома електропровідність σ буде визначатися формулою

$$\sigma = n \frac{e^2}{m^*} \tau \quad (2.6)$$

Де, n – концентрація електронів у металі, m^{-3} ;

Звідси на підставі експериментальних значень електропровідності можна обчислити середній час між актами розсіювання τ . Значення періодичності актів розсіювання повинне відповідати оберненій частоті коливань збуджуючого електронний газ випромінювання. В такому випадку можливий резонансний перехід енергії фотонів до електронів у металі.

Маса атома Au становить 197 атомних одиниць маси (а.о.м. = 1,6605655 · 10⁻²⁷ кг), питома вага при $T = 20^{\circ}\text{C}$ дорівнює 19,2 · 10³ кг · м⁻³ [4], і кожен атом віддає один електрон у зону провідності. Звідси знаходимо концентрацію електронів у золоті: $n=N_e \approx 5,8 \cdot 10^{28} \text{ м}^{-3}$. Для золота при температурі 20 °С питома провідність становить 4,65 · 10⁷ Ом⁻¹м⁻¹, і формула (2.6) дає для τ величину $\sim 3 \cdot 10^{-14}$ сек (Таблиця 2.1) [5]. Провідність металу істотно залежить від температури, тому експериментальне вивчення явища ППР потребує термостабілізацію досліджуваного зразку.

Таблиця 2.1.

Питомі опори металів при різних значеннях температури, 10⁻⁸ Ом·м [5].

Метал	Температура, °С								
	-258	-192	-78	0	100	200	300	400	500
Ag	0,008		1,04	1,468	2,07	2,685		3,979	
Al				2,50	3,86			8,0	
Au	0,014	0,490	1,439	2,065	2,887	3,735	4,615	5,534	6,62
Cu	0,014			1,55	2,28	2,96			5,08
In				8,2					

Зрозуміло, що представлені розрахунки дозволяють дати лише оцінку значення τ , оскільки на розсіювання електронів в металах впливають структура та наявність дефектів, які у плівках можуть істотно відрізнятися від чистих зразків. Але у будь якому разі середній час між актами розсіювання виявляється того ж порядку величини, що й період колювання електромагнітного поля (для $\lambda=0,63\text{мкм}$ $f=4,75 \cdot 10^{14} \text{с}^{-1}$). Це означає, що для електромагнітного поля видимого світла для опису реакції електронів на таких частотах необхідно враховувати їх динамічні властивості.

У класичній теорії дисперсії Лоренца для діелектриків електрон у атомі, з яким взаємодіє електромагнітне поле, розглядається як дипольний осцилятор з загасанням власних колювань, який характеризується певною

власною частотою ω_0 та сталою загасання γ , а рівняння його руху в полі електромагнітної хвилі $\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}$ описується рівнянням для гармонічного осцилятора (2.7).

$$\ddot{\mathbf{x}} + \gamma \dot{\mathbf{x}} + \omega_0^2 \mathbf{x} = -\frac{e}{m} \mathbf{E}'(t), \quad (2.7)$$

Де, \mathbf{x} – зсув електрона відносно положення рівноваги, м.

Напруженість електричного поля, яке безпосередньо діє на осцилятор у суцільному середовищі, є ефективним локальним електричним полем, яке відрізняється від середнього макроскопічного поля \mathbf{E} (для ізотропного середовища та кристалів з кубічною симетрією його величину можна знайти з рівняння $\mathbf{E}' = \mathbf{E} + \mathbf{P}/3\epsilon_0$ [6, 7]). Підстановка розв'язку цього рівняння у вигляді експоненційної залежності (2.8) дає вираз для визначення залежності зсуву електронів від часу (2.9).

$$\mathbf{x}(t) = \mathbf{x}_0 e^{i\omega t}. \quad (2.8)$$

$$\mathbf{x}(t) = -\frac{e/m}{\omega_0^2 - \omega^2 - i\gamma\omega} \mathbf{E}'(t). \quad (2.9)$$

Аналогічним чином можна знайти співвідношення для зсуву вільних електронів під дією змінного електричного поля (модель Друде [8]). В цій моделі середня швидкість електронів в металі описується за допомогою другого рівняння Ньютона, яке, крім зовнішнього електричного поля, містить також силу в'язкого тертя, відповідальну за електричний опір. З точки зору класичної динаміки електронів ця сила є феноменологічним параметром, який враховує вплив розсіювання на їх середню швидкість при усередненні по всьому макроскопічно великому ансамблю. На відміну від зв'язаних електронів, повертаюча сила та, відповідно, власна частота коливань для електронного газу відсутні, і рівняння Ньютона слід застосовувати у наступній формі:

$$\ddot{\mathbf{x}} + \gamma \dot{\mathbf{x}} = -\frac{e}{m} \mathbf{E}(t), \quad (2.10)$$

Для гармонійної залежності напруженості електричного поля від часу

$$\mathbf{E}(t) = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t}, \quad (2.11)$$

розв'язок цього рівняння слід шукати, як і в попередньому випадку, у вигляді (2.8), підстановка якого у рівняння (2.10) дає вираз для комплексної амплітуди \mathbf{x}_0 відповідно до формули:

$$\mathbf{x}(t) = \frac{e}{m(\omega^2 - i\gamma\omega)} \mathbf{E}(t). \quad (2.12)$$

Амплітуда \mathbf{x}_0 враховує фазовий зсув між коливаннями напруженості електричного поля та електронного газу. Останні викликають макроскопічну поляризацію $\mathbf{P} = -ne\mathbf{x}$, яка визначається співвідношенням

$$\mathbf{P} = -\frac{ne^2}{m(\omega^2 - i\gamma\omega)} \mathbf{E} \quad (2.13)$$

Підстановка цього виразу в рівняння (2.1) дає:

$$\mathbf{D} = \epsilon_0 \left(1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\gamma\omega} \right) \mathbf{E}, \quad (2.14)$$

Де, ω_p - плазмова частота газу вільних електронів (2.15).

$$\omega_p^2 = \frac{ne^2}{\epsilon_0 m} \quad (2.15)$$

В результаті отримаємо діелектричну проникність газу вільних електронів:

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 - i\gamma\omega}. \quad (2.16)$$

З цього виразу випливає, що для металів показник заломлення ($n = \sqrt{\epsilon}$) є комплексною величиною. Надалі ми будемо позначати комплексний показник заломлення як $N^* = n - ik$. Нижче буде показано, що для золота експериментальне значення величини N^* на частотах червоної області видимого діапазону становить $\approx 0,2 - i \cdot 3,8$.

Зауважимо, що при отриманні розв'язків рівнянь Максвелла ми враховували реакцію вільного електронного газу на змінне електромагнітне поле за допомогою макроскопічної діелектричної проникності або пов'язаного з нею показника заломлення. Проаналізуємо межі застосування таких наближень.

Макроскопічні рівняння Максвелла можна застосовувати, якщо:

- а) міжатомні відстані істотно менші як за довжину хвилі, так і за товщину скін-шару (глибини проникнення електромагнітної хвилі у поглинаюче середовище);
- б) середня довжина вільного пробігу електронів значно менша у порівнянні з характерними розмірами задачі та відстанями, на яких помітно змінюється напруженість електричного поля, тобто за довжину хвилі та товщину скін-шару.

Оцінку довжини вільного пробігу електронів у металі можна зробити, якщо відомий середній час між актами розсіювання, який було вираховано вище (2.5), та швидкість електронів. Для обчислення останньої, поведінку електронного газу у металі треба розглядати з квантовомеханічних позицій. Відповідно до принципу Паулі, електронні стани з енергією нижче енергії Фермі E_F заповнені, тому участь в електропровідності можуть брати лише ті електрони, енергія яких лежить у межах $\sim E_F \pm k_B T$, де k_B – стала Больцмана, а T – абсолютна температура. Тому, для оцінки довжини вільного пробігу слід брати швидкість електронів, яка відповідає енергії Фермі. Якщо загальна кількість електронів дорівнює N , то значення хвильового вектора на поверхні Фермі дорівнює:

$$k_F = \left(\frac{3\pi^2 N}{V} \right)^{1/3}, \quad (2.17)$$

Де, V – реальний об’єм зразка. Відповідно, для енергії Фермі, з урахуванням квантовомеханічного виразу для імпульсу частинки $p = \hbar k$, отримаємо:

$$E_F = \frac{\hbar^2}{2m} \left(\frac{3\pi^2 N}{V} \right)^{1/3} \quad (2.18)$$

Звідси можна одержати швидкість електронів на поверхні Фермі:

$$v_F = \sqrt{\frac{2E_F}{m^*}} \quad (2.19)$$

Виникає питання - чи можна користуватися значеннями енергії Фермі E_F масивного металу у випадку тонких плівок. В роботах [9, 10] був проведений теоретичний розрахунок розмірної залежності енергії Фермі та відносного відхилення сталої ґратки δa тонких плівок міді та золота в рамках теорії функціоналу густини. Було показано, що для плівок завтовшки від 2 до 3 моноатомних шарів енергія Фермі дійсно зростає до величин, які перевищують енергію Фермі масивного зразка у 1,8 – 1,9 разів, але при збільшенні товщини до 20 і більше моношарів енергія Фермі прямує до свого об’ємного значення. Отже, вважатимемо, що для плівок золота завтовшки ~40 нм можна користуватись значенням E_F масивного зразка.

Скориставшись значенням концентрації електронів у золоті $n_e \approx 5,8 \cdot 10^{28} \text{ м}^{-3}$, знайденим вище при отриманні середнього часу між актами розсіювання $\tau \sim 3 \cdot 10^{-14} \text{ с}$, отримаємо для v_F значення $1,39 \times 10^6 \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$, звідки довжина вільного пробігу становитиме 10 нм. Це значення дійсно набагато менше за довжину хвилі червоного світла (~650 нм у вакуумі), але приблизно дорівнює оптимальній товщині плівки золота, яка використовується для збудження поверхневого плазмонного резонансу і навіть перевищує глибину проникнення світла у металі (типове значення для видимого світла

10..20 нм). Тому до результатів знаходження матеріальних параметрів досліджуваної системи з резонансних кривих ППР, обчислених на підставі макроскопічних рівнянь Максвелла, слід ставитися з обережністю, розуміючи, що одержані значення оптичних сталих металу слід вважати ефективними, і що вони можуть відрізнятися від значень, отриманих за допомогою інших методів.

З урахуванням виразу (2.16) для діелектричної проникності газу вільних електронів в залежності від частоти можна зробити кількісну оцінку вигляду закону дисперсії поверхневих плазмонів (2.9). Знехтувавши при цьому дисипаційним членом $i\gamma\omega$, запишемо (2.16) як (2.20).

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (2.20)$$

і підставимо цей вираз у (2.7). З отриманого співвідношення знаходимо ω^2 як розв'язок біквадратного рівняння:

$$\omega^4 - \omega^2 \left(\omega_p^2 + \frac{\beta^2 c^2}{\epsilon_2} + \beta^2 c^2 \right) + \omega_p^2 \frac{\beta^2 c^2}{\epsilon_2} = 0 \quad (2.21)$$

Його рішення набуває особливо простого вигляду, якщо покласти $\epsilon_2=1$, тобто розглядати плазмон на границі з повітрям або вакуумом:

$$\omega^2 = \frac{\omega_p^2 + 2\beta^2 c^2}{2} - \sqrt{\frac{\omega_p^4 + 4\beta^4 c^4}{4}} \quad (2.22)$$

Ефективна маса електронів у золоті дорівнює 0,99 від маси вільного електрона [11], а концентрація електронів становить $n_e \approx 5,8 \cdot 10^{28} \text{ м}^{-3}$, звідки знаходимо числове значення плазмонної частоти: $\omega_p = 1,37 \cdot 10^{16} \text{ с}^{-1}$. Розрахована дисперсійна крива показана на рис. 2.1. Вона описує залежність

частоти коливань електронного газу (плазмону) від величини постійної розповсюдження електромагнітної хвилі поверхневого плазмонного резонансу.

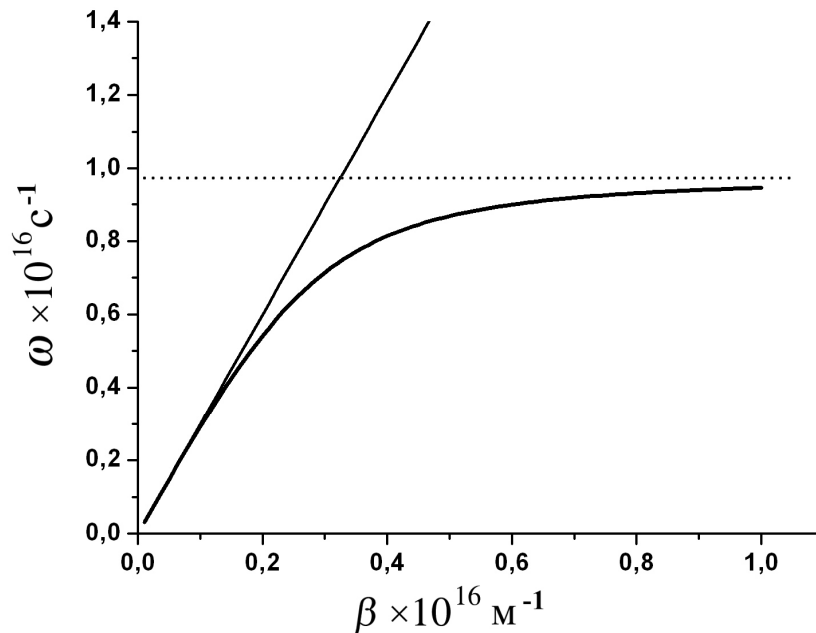


Рис.2.1. Дисперсійна крива для коливань електронної плазми у золоті.

Для малих значень постійної розповсюдження β вона наближається до прямої $\omega = 2\pi c/\lambda$, яка описує дисперсію світла у вільному просторі, а для великих значень асимптотично наближується до значення $\omega_p/\sqrt{2}$. При цьому постійна розповсюдження поверхневого плазмона завжди залишається більшою за постійну розповсюдження світла при даній частоті, що унеможливорює його випромінювання у зовнішнє середовище.

Явище ППР застосовують у сенсорних приладах, оскільки частота поверхневого плазмону чутлива до зміни постійної розповсюдження, котра визначається як діелектричною проникністю середовища, так і відносною магнітною проникністю, зміна котрих суттєво впливає на розповсюдження поверхневої електромагнітної хвилі, що може бути виміряне рефрактометричними методами.

2.1.1. Типи плазмонів.

Плазмони виникають в твердих тілах або в приповерхневому шарі цих тіл в результаті колективних коливань електронів провідності відносно іонів. Плазмон є квазічасткою, яка утворюється в провідниках та напівпровідниках. Об'ємні плазмони описують коливання електронів провідності всередині кристалічної ґратки. Поверхневі плазмони це хвилі змінної щільності електричного заряду, які можуть утворюватись і розповсюджуватись в електронній плазмі металу вздовж його поверхні або вздовж тонкої металевої плівки. Поверхневий плазмон розповсюджується вздовж границі провідника (напівпровідника) і діелектрика, при цьому електричне поле, перпендикулярне до поверхні розділу, спадає за експонентою в міру віддалення від поверхні. Частота плазмону дорівнює частоті плазми [12]. Плазмони відіграють значну роль в оптичних властивостях металів. Електромагнітна хвиля з частотою нижчою за частоту плазмону відбивається від поверхні металу, а з частотою вищою проходить крізь метал.

Для більшості металів, частота плазмону знаходиться в ультрафіолетовій ділянці спектру (для золота, наприклад, становить $\omega_p = 1,37 \cdot 10^{16} \text{с}^{-1}$, що відповідає довжині хвилі 137 нм), роблячи їх блискучими в видимому діапазоні світла (від 370 нм до 750 нм). В легованих напівпровідниках частота плазмону переважно знаходиться в інфрачервоній ділянці спектру [13].

Існує два основних типи поверхневих плазмонів (ПП): протяжні та локалізовані. Протяжний ПП (ПППР) розглядається як більш класичний оскільки він був відомий вже довгий час. Він може бути описаний як повздовжня електромагнітна хвиля в двовимірному електронному газі котрий існує на поверхні між металом та діелектриком. З іншої сторони локалізовані ПП стали більш відомі лише протягом останніх двох десятиліть. Вони існують в металічних структурах з розміром меншим за половину довжини хвилі збуджуючого електромагнітного випромінювання. В обох випадках

падаюча електромагнітна хвиля має бути поляризованою в площині падіння (поперечна магнітна (ТМ) поляризація). У випадку протяжного чи розповсюдженого плазмонного резонансу, плазмон розповсюджується вздовж поверхні між металом та діелектриком на відстань порядку від 10 до 100 мкм та зменшується загасаючи в z- напрямку з декрементом $1/e$ на відстань порядку 200 нм. Взаємодія між поверхнею металу обмеженою ЕМ хвилями та молекулярним шаром в результаті призводить до зсуву в плазмонному резонансі, який може спостерігатися в трьох режимах: (а) зміною (регулюванням) кута (б) зсувом довжини хвилі, та (в) телевізійним методом. В перших двох режимах, вимірюється відбиття світла від поверхні металу як функція або від довжини хвилі (при постійному куті падіння) або як функція від кута падіння (при постійній довжині хвилі). Третій режим використовує світло як при постійній довжині хвилі, так і при постійному куті падіння для опромінення двовимірного зразка, фіксації карти відбиття від зразку як функцію координатного положення.

Для випадку локалізованого ППР, світло взаємодіє з частинками набагато меншими від довжини хвилі падаючого світла. Це викликає плазмон котрий коливається локально навколо наночастинки з частотою відомою як частота ЛППР. Подібно до ПППР, ЛППР чутливий до змін в локальному діелектричному середовищі. Зазвичай, дослідники вимірювали зміни в локальному діелектричному середовищі за допомогою ЛППР вимірюванням зсуву довжини хвилі, також можливе вимірювання шляхом вимірювання кута. Обидва режими (ПППР та ЛППР) можуть забезпечувати даними термодинаміки та кінетики в реальному часі для процесів зв'язування. Хоча ПППР спектроскопія забезпечує вищу чутливість до змін показника заломлення зовнішнього середовища ніж ЛППР спектроскопія, відгук від двох технік стає близький за значенням при вимірюванні короткого діапазону (в нм в околі поверхні металу) змін показника заломлення що відповідає адсорбованому молекулярному шару. Це результат набагато меншої

чутливості ЛППР сенсорів, через те, що ефективна глибина проникнення ЕМ поля в 40-50 разів коротше ніж у сенсорів ПППР. Більш того, нововведення в синтетичній та літографічній техніці виробництва дозволяє настроїти довжину хвилі локалізованого резонансу також в видимій, нижній ІЧ, та аж до ІЧ областях ЕМ спектру, для різноманітної форми, розміру та матеріалу наночастинок котрі підтримують ЛППР. Це додає додаткової гнучкості при проектуванні експериментів з ЛППР сенсингом.

2.1.2. Поверхневі електромагнітні хвилі

Поверхневі електромагнітні хвилі можуть виникати на поверхні кристалів напівпровідників та діелектриків на частотах в околі частоти ізольованих полярних збуджень, наприклад, полярних оптичних фононів [14]. Для електромагнітних хвиль, частоти яких знаходяться в околі частот дипольно активних переходів у кристалах, часто застосовують термін “поляритон”, чим підкреслюється їх змішана електромагнітно-механічна природа. Тому поверхневі електромагнітні хвилі такого типу називають *поверхневими поляритонами*. У металах діелектрична стала має від’ємне значення за рахунок колювання плазми вільних електронів, тому поверхневі хвилі на межі діелектрик-метал називають поверхневими поляритонами плазмонного типу, або просто *поверхневими плазмонами*. Оскільки поверхневі плазмони можуть збуджуватися на частотах, які знаходяться далеко від резонансної частоти об’ємного плазмону, цей термін не повинен викликати непорозумінь. Крім того, він набув широкого розповсюдження в літературі, присвяченій біосенсорам на основі цього ефекту, тому надалі ми будемо використовувати його, як синонім поняття “поверхнева плазмова хвиля”.

2.1.3. Умови існування поверхневого плазмонного резонансу

Поверхневий плазмонний резонанс (ППР) це явище порушення умови повного внутрішнього відбиття, коли значна частина енергії падаючого на поверхню металу світла перетворюється в енергію плазмонів, внаслідок чого інтенсивність відбитого від поверхні металевої плівки світла різко спадає. ППР спостерігається при умові повного внутрішнього відбиття і характеризується певним кутом відбиття та значенням показника заломлення речовини над поверхнею металу.

Поверхневий плазмон безпосередньо не пов'язаний з електромагнітним випромінюванням в середовищі контактуючому з металом через те, що швидкість плазмону менша за швидкість світла. Технічний спосіб, який дозволяє використовувати поверхневі плаزمони в оптиці, базується на використанні повного внутрішнього відбиття. При повному внутрішньому відбитті вздовж поверхні, яка відбиває світло, розповсюджується електромагнітна хвиля, швидкість якої менша за швидкість світла і залежить від кута падіння випромінювання. Якщо при певному куті падіння швидкість цієї хвилі співпадає зі швидкістю поверхневого плазмону на поверхні металу, то умова повного відбиття порушується і відбиття перестає бути повним, виникає поверхневий плазмонний резонанс. Але в металічних нанорозмірних системах виникає модифікація колективних електронних збуджень. Внаслідок малих розмірів системи вимога до співпадіння швидкості розповсюдження збудження і електромагнітної хвилі відпадає, тому поверхневі плаزمони безпосередньо пов'язані зі збуджуючим випромінюванням [13].

Збудження ППР стає особливо ефективним при наступних умовах:

1. Світло, що падає на поверхню металу, поляризоване;
2. Електричний вектор електромагнітної хвилі лежить в площині падіння, а магнітний вектор паралельний поверхні металу;

3. Проекція хвильового вектору фотонів світла k_x на площину металевої плівки дорівнює хвильовому вектору поверхневого плазмону k_{SP} .

Тому для збудження поверхневих плазмонів джерело світла має бути поляризованим у площині падіння (мати р-поляризацію) та довжина її хвилі має співпадати з довжиною хвилі поверхневого плазмону.

2.2. Методи збудження поверхневих плазмонів

Найбільш поширений метод збудження поверхневих плазмонів реалізується за допомогою призми зв'язку і явища повного внутрішнього відбиття (ПВВ). Існує дві оптичні схеми для реалізації такого методу збудження – геометрія Кречмана [15] і геометрія Отто [16]. В геометрії Кречманна за умови ПВВ призма з високим показником заломлення n_p сполучена з метал-діелектричним хвилеводом, що складається з тонкої металевої плівки з діелектричною проникністю ϵ_m та товщиною d і напівнескінченим діелектриком з показником заломлення n_d (рис. 2.2).

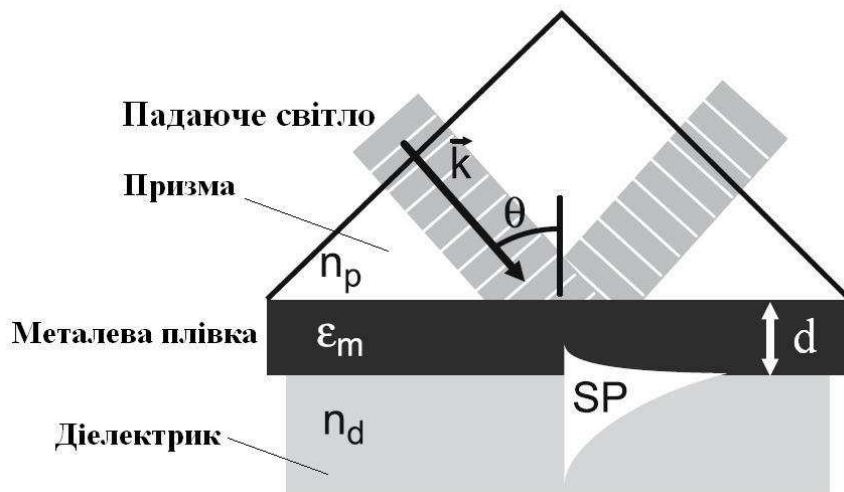


Рис.2.2. Схема збудження поверхневих плазмонів в геометрії Кречмана за умови порушеного повного внутрішнього відбиття [14].

Причому для забезпечення існування ПВВ має виконуватись умова $n_d < n_p$. Коли електромагнітна хвиля, що розповсюджується в призмі, падає на металеву плівку частина світла відбивається назад в призму і частина

поширюється в металі у вигляді неоднорідної електромагнітної хвилі [17]. Ця неоднорідна електромагнітна хвиля за експонентою загасає у напрямку, котрий перпендикулярний до межі поділу призма-метал і отримала назву загасаючої хвилі (evanescent wave). Якщо металева плівка досить тонка (менше 100 нм для електромагнітних хвиль у видимій і ближній інфрачервоній частинах спектру), то загасаюча хвиля проникає через металеву плівку і взаємодіє з поверхневим плазмоном на її зовнішній поверхні. Постійна поширення поверхневих плазмонів β_{SP} залежить від наявності діелектрика на протилежній стороні металевої плівки і залежить від його діелектричної проникності, частоти електромагнітного випромінювання, що збуджує поверхневий плазмон, та діелектричної проникності металічної плівки (2.23).

$$\beta^{SP} = \beta^{SP_0} + \Delta\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} + \Delta\beta, \quad (2.23)$$

де, β_{SP} – постійна поширення поверхневих плазмонів;

β_{SP_0} – постійна поширення поверхневих плазмонів, що поширюються вздовж хвилеводу метал-діелектрик за відсутності призми;

$\Delta\beta$ – параметр, що враховує кінцеву товщину металевої плівки і наявність призми;

ω – колова частота електромагнітного випромінювання, що збуджує поверхневий плазмон, с^{-1} ;

ε_d – діелектрична проникність діелектричного шару, Ф/м;

ε_m – діелектрична проникність металевої плівки, Ф/м;

c – швидкість світла в вакуумі, $c = 2,9979 \cdot 10^8$ м/с;

Для забезпечення умови передачі енергії загасаючої хвилі поверхневому плазмону необхідно, щоб постійна розповсюдження загасаючої хвилі скороминущої β_{EW} і постійна поширення поверхневого

плазмону β_{SP} були рівні за величиною (2.23), що можна виразити з точки зору ефективного показника заломлення n_{ef} для оптичної системи (2.24, 2.25).

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_p \sin \theta = k_z = \beta^{EW} = \text{Re} \{ \beta^{SP} \} = \text{Re} \left\{ \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} + \Delta \beta \right\} \quad (2.24)$$

$$n_p \sin \theta = n_{ef}^{EW} = n_{ef}^{SP} = \text{Re} \left\{ \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} \right\} + \Delta n_{ef}^{SP} \quad (2.25)$$

На рис. 2.3 показано спектральну залежність ефективного показника заломлення для різних кутів падіння електромагнітної хвилі на межу середовищ золото-вода для призми зі скла ВК7 [18]. Для кожної довжини хвилі умова узгодження виконана для одного кута падіння світла.

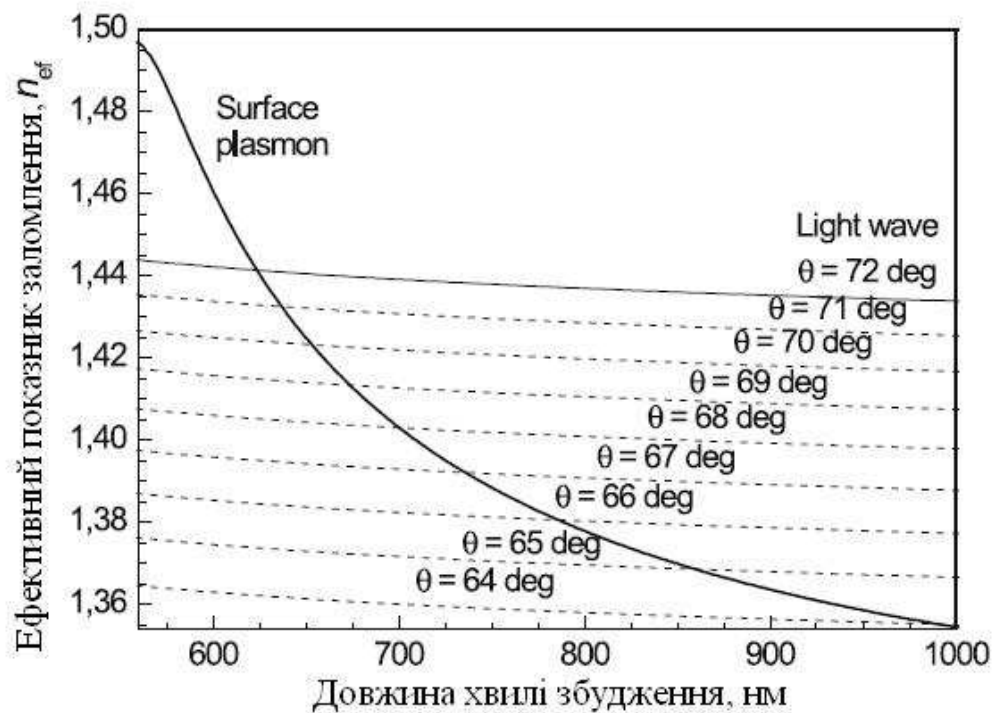


Рис.2.3. Спектральна залежність ефективного показника заломлення [14].

В геометрії Отто призма з показником заломлення n_p сполучена з хвилеводом діелектрик-метал, що складається з тонкої діелектричної плівки з показником заломлення n_d ($n_d < n_p$) з товщиною d і напівнескінченим металом з діелектричної проникністю ε_m (рис. 2.4).

В геометрії Отто, світлова хвиля, котра падає на межу розділу призма-діелектрик під кутом падіння більшим за кут ПВВ для цих двох середовищ, утворює вторинну загасаючу хвилю, що розповсюджується вздовж межі розділу між призмою і діелектричним шаром.

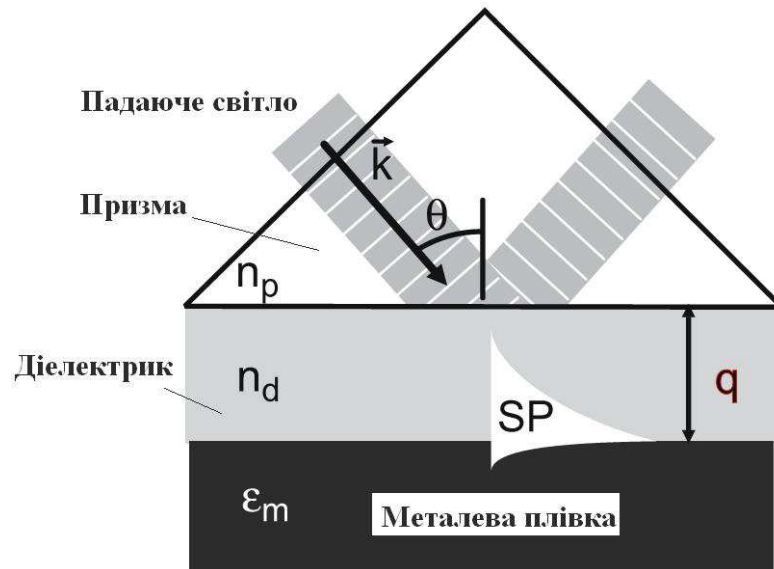


Рис.2.4. Схема збудження поверхневих плазмонів в геометрії Отто за умови порушеного повного внутрішнього відбиття [14].

Умовою для передачі енергії від фотонів збуджуючого електромагнітного випромінювання до поверхневого плазмону є рівність постійних поширення загасаючої хвилі і поверхневого плазмону. Метод порушеного повного внутрішнього відбиття може бути застосований до такої геометрії й при наявності тонкої плівки металу. Зв'язування фотонів світла для симетричного або антисиметричного поверхневого плазмону в тонкій плівці металу може бути в принципі досягнуто в геометрії, аналогічній геометрії Отто (рис. 2.4), в якій напівнескінченний метал замінюється тонкою металевою плівкою [19].

Взаємодію між електромагнітними хвилями і поверхневим плазмоном за умови ПВВ може бути досліджено за допомогою теорії Френеля для багатошарового відбиття [20]. Характеристику відбиття $R(\theta)$ можна розраховувати як функцію кута падіння, використовуючи формули Френеля і

математичний формалізм матриць розсіювання Джонса [21], на основі методики [22]. Для цього розглядається багатошарова планарна структура, що складається з набору $1, 2, 3, \dots, j, \dots, m$ рівнобіжних шарів, розміщених між двома напівнескінченими середовищами: навколишнім середовищем (0) і підкладкою ($m + 1$) (Рис.2.5.). Нехай усі середовища лінійні, однорідні і ізотропні, комплексний показник заломлення j -го шару дорівнює N_j , а його товщина d_j . Комплексні показники заломлення середовища і підкладки рівняються N_0 і N_{m+1} .

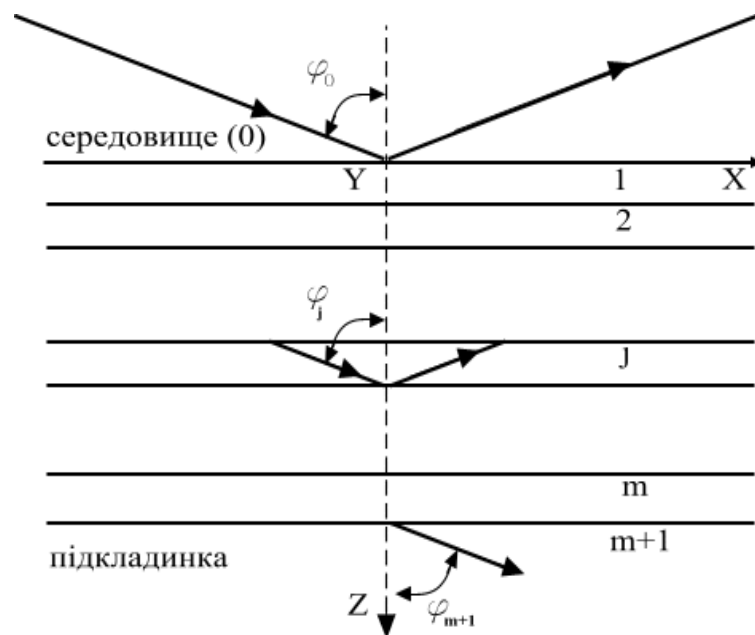


Рис.2.5. Проходження плоскою електромагнітною хвилею багатошарової структури [21].

Падаюча монохроматична плоска хвиля в середовищі 0 (навколишнє середовище) породжує результуючу відбиту плоску хвилю в середовищі 0 і результуючу плоску хвилю що пройшла межу розподілу в середовищі $m+1$ (підкладка). Повне поле усередині j -го шару, збуджене падаючою плоскою хвилею, є результатом додавання полів двох плоских хвиль: плоскої хвилі що розповсюджується вперед (до середовища $m+1$), позначеної (+), і плоскої хвилі що поширюється в зворотному напрямку (до середовища 0), позначеної

(-). Хвильові вектори всіх розглянутих плоских хвиль лежать в одній і тій же площині (площини падіння), а хвильові вектори двох плоских хвиль у j-м шарі утворюють рівні кути з віссю z, перпендикулярної плоским границям і спрямованої до підкладки. Якщо падаюча хвиля в середовищі 0 лінійно поляризована, причому її електричний вектор паралельний (p) чи перпендикулярний (s) площини падіння, то всі плоскі хвилі, порушувані цією падаючою хвилею в різних шарах багатошарової структури, поляризовані подібним же чином, тобто паралельно чи перпендикулярно площини падіння.

Величини $E^+(z)$ і $E^-(z)$ позначають комплексні амплітуди плоских хвиль, що поширюються в прямому і зворотньому напрямках в площині z. Повне поле в площині z може бути описане вектором-стовпцем [21]:

$$\ddot{\mathbf{E}}(z) = \begin{bmatrix} E^+(z) \\ E^-(z) \end{bmatrix} \quad (2.26)$$

Якщо розглядати поля в двох різних площинах z' і z'' , паралельних границям шару, то, в силу лінійності, системи $\mathbf{E}(z'')$ і $\mathbf{E}(z')$ повинні бути зв'язані перетворенням [21]:

$$\begin{bmatrix} E^+(z') \\ E^-(z') \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E^+(z'') \\ E^-(z'') \end{bmatrix} \quad (2.27)$$

Вираз (2.27) можна записати в більш короткій формі:

$$\mathbf{E}(z') = \mathbf{S} \mathbf{E}(z'') \quad (2.28)$$

Матриця \mathbf{S} повинна характеризувати ту частину шаруватої структури, що розміщена між двома паралельними площинами z' і z'' .

Якщо вибрати z' і z'' так, щоб вони лежали на протилежних сторонах межі розподілу $(j - 1)$, розташованої в площині z_j між шарами $j - 1$ і j , то співвідношення (2.28) приймає вигляд [21]:

$$\mathbf{E}(z_j - 0) = \mathbf{I}_{(j-1)j} \mathbf{E}(z_j + 0), \quad (2.29)$$

Де величина $\mathbf{I}_{(j-1)j}$ являє собою 2×2 матрицю, що характеризує тільки межу розподілу $(j-1)j$. Якщо ж z' і z'' вибираються усередині j -шару на його границях, то співвідношення (2.29) приймає вид [21]:

$$\mathbf{E}(z_j + 0) = \mathbf{L}_j \mathbf{E}(z_j + d_j + 0), \quad (2.30)$$

У формулі (2.30) 2×2 матриця \mathbf{L}_j характеризує тільки j -й шар товщини d_j . Для вимірювання доступні тільки параметри відбитої хвилі в зовнішньому середовищі і параметри хвилі що пройшла межу розподілу в підкладці, так що необхідно зв'язати поля цих хвиль з полем падаючої хвилі. Якщо вибрати площини z' і z'' таким чином, щоб вони лежали в зовнішньому середовищі і підкладці і безпосередньо примикали до меж розподілу $0-1$ і $m - (m+1)$, то співвідношення (2.28) прийме вигляд [21]:

$$\mathbf{E}(z_1 - 0) = \mathbf{S} \mathbf{E}(z_{m+1} + 0), \quad (2.31)$$

Співвідношення (2.27) визначає матрицю розсіювання \mathbf{S} , що описує загальні властивості відбиття і пропускання світла шаруватою структурою. Матрицю \mathbf{S} можна представити як добуток матриць меж розподілу \mathbf{I} та шарів \mathbf{L} , що описують вплив окремих шарів і меж розподілу у всій шаруватій структурі, записавши їх у наступному порядку [21]:

$$\mathbf{S} = \mathbf{I}_{01} \mathbf{L}_1 \mathbf{I}_{12} \mathbf{L}_2 \dots \mathbf{I}_{(j-1)j} \mathbf{L}_j \dots \mathbf{L}_m \mathbf{I}_{m(m+1)} \quad (2.32)$$

Співвідношення (2.32) утворюється, якщо застосувати співвідношення (2.28) до послідовних меж розподілу і шарів структури, починаючи з границі між зовнішнім середовищем і першою плівкою (0-1) і закінчуючи границею між останньою плівкою і $[m(m+1)]$ -й підкладкою.

Співвідношення (2.32) показує, що для визначення матриці розсіювання \mathbf{S} шаруватої структури необхідно розрахувати матриці всіх окремих границь розподілу \mathbf{I} і всіх шарів \mathbf{L} .

Матриця \mathbf{I} границі між двома середовищами a і b зв'язана з полями по обох її сторонах (тобто в середовищах a і b) наступним співвідношенням [21]:

$$\begin{bmatrix} E_a^+ \\ E_a^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{11} & I_{12} \\ I_{21} & I_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_b^+ \\ E_b^- \end{bmatrix} \quad (2.33)$$

Визначимо чисельно вираз для матриць границь розподілу \mathbf{I} і матриць шарів \mathbf{L} . Розглянемо випадки, коли одна плоска хвиля падає на межу розподілу a - b .

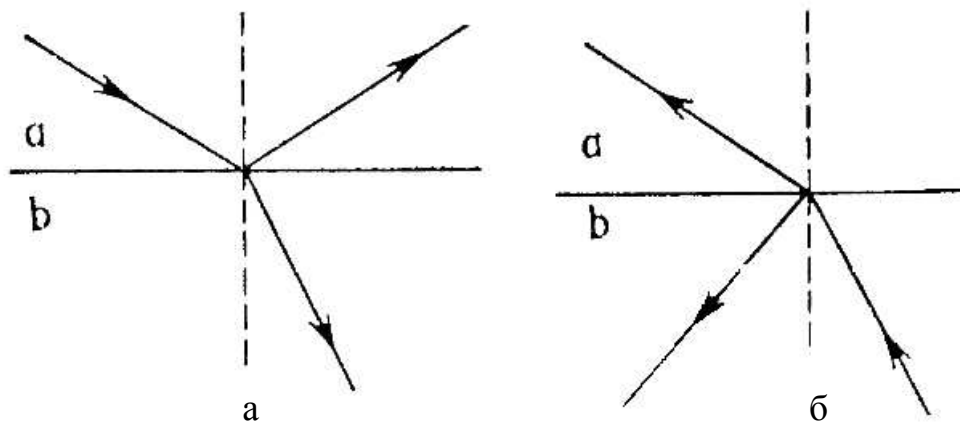


Рис.2.6. Випадки променезаломлення на межі двох середовищ.

Комплексні амплітуди плоскої хвилі, що пройшла межу розподілу, і відбитої плоскої хвилі у середовищах b і a (Рис.2.6.а) можуть бути виражені

через комплексну амплітуду E_a^+ падаючої плоскої хвилі в середовищі a і $E_b^- = 0$, де r_{ab} і t_{ab} – френелівські коефіцієнти відбиття і пропускання для межі розподілу a - b :

$$E_b^+ = t_{ab} E_a^+, \quad (2.34a)$$

$$E_a^- = r_{ab} E_a^+ \quad (2.34b)$$

З іншого боку, відповідно до (2.33), ми маємо співвідношення:

$$\begin{bmatrix} E_a^+ \\ E_a^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{11} & I_{12} \\ I_{21} & I_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_b^+ \\ 0 \end{bmatrix} \quad (2.35)$$

Розкладання співвідношення (2.35) дає наступні рівності:

$$E_a^+ = I_{11} E_b^+, \quad (2.36a)$$

$$E_a^- = I_{21} E_b^+ \quad (2.36b)$$

Порівнюючи (2.34) і (2.36), одержуємо наступне:

$$I_{11} = 1/t_{ab}, \quad (2.37)$$

$$I_{21} = r_{ab}/t_{ab} \quad (2.38)$$

Розглянемо тепер плоску хвилю, що падає на границю b - a із середовища b (Рис.2.6. б), під кутом падіння, рівним куту заломлення в середовищі b у попередньому випадку. Тепер поля на границі b - a зв'язані співвідношеннями:

$$E_b^+ = r_{ba} E_b^-, \quad (2.39a)$$

$$E_a^- = t_{ba} E_b^- \quad (2.396)$$

При $E_a^+ = 0$, де r_{ba} і t_{ba} – френелівські коефіцієнти відбиття і пропускання для межі розподілу ба. З іншого боку, відповідно до співвідношення (2.33) для даного випадку ми маємо наступне співвідношення:

$$\begin{bmatrix} 0 \\ E_a^- \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} I_{11} & I_{12} \\ I_{21} & I_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E_b^+ \\ E_b^- \end{bmatrix} \quad (2.40)$$

$$0 = I_{11} E_b^+ + I_{12} E_b^-$$

$$E_a^- = I_{21} E_b^+ + I_{22} E_b^-$$

При підстановці виразів (2.37) і (2.38) для I_{11} і I_{21} у (2.40) одержуємо наступні рівності:

$$E_b^+ = -I_{12} t_{ab} E_b^-, \quad (2.41a)$$

$$E_a^- = \left[\frac{r_{ab} r_{ba}}{t_{ab}} + I_{22} \right] E_b^- \quad (2.416)$$

Порівняння виразів (2.39) і (2.41) дає:

$$I_{12} = -r_{ba}/t_{ab}, \quad (2.42)$$

$$I_{22} = (t_{ab} t_{ba} - r_{ab} r_{ba})/t_{ab}. \quad (2.43)$$

Використовуючи співвідношення між френелівськими коефіцієнтами для двох напрямків поширення [21], а саме $r_{ba} = -r_{ab}$ і $t_{ba} = (1 - r_{ab}^2)/t_{ab}$, одержуємо матрицю границі розподілу:

$$\mathbf{I}_{ab} = \begin{bmatrix} 1/t_{ab} & r_{ab}/t_{ab} \\ r_{ab}/t_{ab} & 1/t_{ab} \end{bmatrix} = (1/t_{ab}) \begin{bmatrix} 1 & r_{ab} \\ r_{ab} & 1 \end{bmatrix} \quad (2.44)$$

Френелівські коефіцієнти відбиття і пропускання для границі розподілу, що фігурують у виразі (2.42) повинні бути розраховані, виходячи зі значень комплексних показників заломлення розглянутих двох середовищ, що утворюють границю розділу, і значень кута падіння в даному місці. Останній можна знайти, послідовно застосовуючи закон Снеліуса [21]:

$$N_0 \sin \phi_0 = N_1 \sin \phi_1 = \dots = N_j \sin \phi_j = \dots N_{m+1} \sin \phi_{m+1} \quad (2.45)$$

Розглянемо взаємозв'язок між полями на верхній і нижній границях шару з показником заломлення N і товщиною d . Цей взаємозв'язок може бути виражений в такий спосіб:

$$\begin{bmatrix} E^+_0 \\ E^-_0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} e^{j\beta} & 0 \\ 0 & e^{-j\beta} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E^+_d \\ E^-_d \end{bmatrix}, \quad (2.46)$$

В формулі (2.46) нижні індекси 0 і d указують верхню і нижню границі шару (уздовж напрямку хвилі, що поширюється вперед,), а фазове зрушення (фазова товщина шару) β , визначається співвідношенням:

$$\beta = \frac{2\pi d N}{\lambda} \cos \phi, \quad (2.47)$$

де ϕ - кут між напрямком поширення в шарі і перпендикуляром до його границь (віссю z).

Отже, матрицю шару **L** можна записати у наступному вигляді:

$$L = \begin{pmatrix} e^{j\beta} & 0 \\ 0 & e^{-j\beta} \end{pmatrix}, \quad (2.48)$$

З матриць границі розподілу **I** і шару **L** (формули 2.44 і 2.48) матричним множенням відповідно до співвідношення (2.44) можна одержати повну матрицю розсіювання **S** шаруватої структури. Співвідношення (2.31) можна записати в такий спосіб:

$$\begin{bmatrix} E^+_a \\ E^-_a \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} E^+_s \\ 0 \end{bmatrix}, \quad (2.49)$$

В виразі (2.49) нижні індекси *a* і *s* належать до зовнішнього середовища і підкладки, $E^-_s = 0$. Розгортаючи співвідношення (2.49), можна знайти повні коефіцієнти відбиття і пропускання шаруватої структури:

$$R = \frac{E^-_a}{E^+_a} = \frac{S_{21}}{S_{11}} \quad (2.50)$$

$$T = \frac{E^+_s}{E^+_a} = \frac{1}{S_{21}} \quad (2.51)$$

Як видно з виразів (2.50) і (2.51), тільки елементи першого стовпця матриці розсіювання **S** визначають повні коефіцієнти відбиття і пропускання шаруватих структур.

Було розраховано матрицю розсіювання **S** шаруватої структури (точніше її елементи S_{11} і S_{21}) для обох лінійних поляризацій: паралельної (p) і перпендикулярної (s) площині падіння. Нехай S_p і S_s – матриці розсіювання

для p- і s-поляризацій. Коефіцієнти відбиття і пропускання для p- і s-поляризацій приймають вид:

$$R_p = \frac{S_{21p}}{S_{11p}} \quad (2.52)$$

$$R_s = \frac{S_{21s}}{S_{11s}} \quad (2.53)$$

$$T_p = \frac{1}{S_{21p}} \quad (2.54)$$

$$T_s = \frac{1}{S_{21s}} \quad (2.55)$$

Методи збудження ППР мають різну межу детектування та чутливість до зміни ПЗ аналіту внаслідок адсорбції на поверхні ЧЕ хімічних речовин чи молекул. Величина межі детектування визначає найменшу зміну ПЗ аналіту при умові, що кутовий зсув мінімуму кривої ППР при цьому перевищує рівень власних шумів ППР-приладу. Збільшення чутливості призводить до зменшення межі детектування, що дає корисний ефект, так як робить можливим вимірювання менших концентрацій аналіту [23]. Технічні характеристики найбільш поширених в світі методів збудження на основі ППР наведені в Таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Характеристики методів збудження поверхневих плазмонів в ППР-приладах

Вимірюваний параметр	Метод збудження	Розмірність чутливості (шуму)	Чутливість	Рівень шуму	Межа детектування, RIU	Посилання
Резонансний кут	Призмовий	град/RIU (градуси)	66	$1 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-6}$	[24]
			204		$5 \cdot 10^{-7}$	[25]
			160		$6 \cdot 10^{-7}$	[26]
			650		$1,5 \cdot 10^{-7}$	[27]
Резонансна довжина хвилі	Призмовий	нм/RIU (нм)	2750	0,019	$7 \cdot 10^{-6}$	[24]
			30000	0,075	$2,5 \cdot 10^{-6}$	[28]
			57000	0,014	$2,5 \cdot 10^{-7}$	[29]
Інтенсивність відбитого світла	Призмовий	% / RIU (%)	3900	0,20	$5 \cdot 10^{-5}$	[23]
			15000	0,15	$1 \cdot 10^{-5}$	
	Гратковий		4400	0,22	$5 \cdot 10^{-5}$	[30]

Через те, що найменшу межу детектування можна досягти саме призмовим методом збудження з вимірюванням кутового положення мінімуму кривої ППР, в наступних розділах основна увага буде приділена саме цьому методу.

Таким чином, постійна поширення поверхневих плазмонів вельми чутлива до змін у розподілу показника заломлення, що може бути продемонстровано з допомогою теорії збурень. Поверхневі плазмони можна порушити за допомогою (I) з'єднання призми і порушеного повного відображення, (II) дифракції на дифракційної решітці металу, і (III) зчеплення між паралельними оптичними хвилеводами з світлових хвиль.

Найбільшу чутливість можна досягнути призмовим методом збудження, тому наступні розділи книги присвячені саме цьому методу збудження поверхневих оптичних хвиль.

РОЗДІЛ 3

ПРИНЦИП РОБОТИ ТА ОСОБЛИВОСТІ ПРИЛАДІВ НА ОСНОВІ ЯВИЩА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

3.1. Принцип роботи приладів на основі поверхневого плазмонного резонансу

Принцип роботи ППР-приладів полягає у визначенні зміни показника заломлення (ПЗ) аналіту шляхом вимірювання зсуву мінімуму характеристики відбиття $R(\theta)$ внаслідок цієї зміни. Переважна більшість ППР-приладів побудована за геометрією Кречмана (Рис.3.1.,а), яка складається з джерела збудження поверхневих плазмонів 1, призми ПВВ 2 (більш оптично щільне середовище), чутливого елементу 3 та фотоприймача 4.

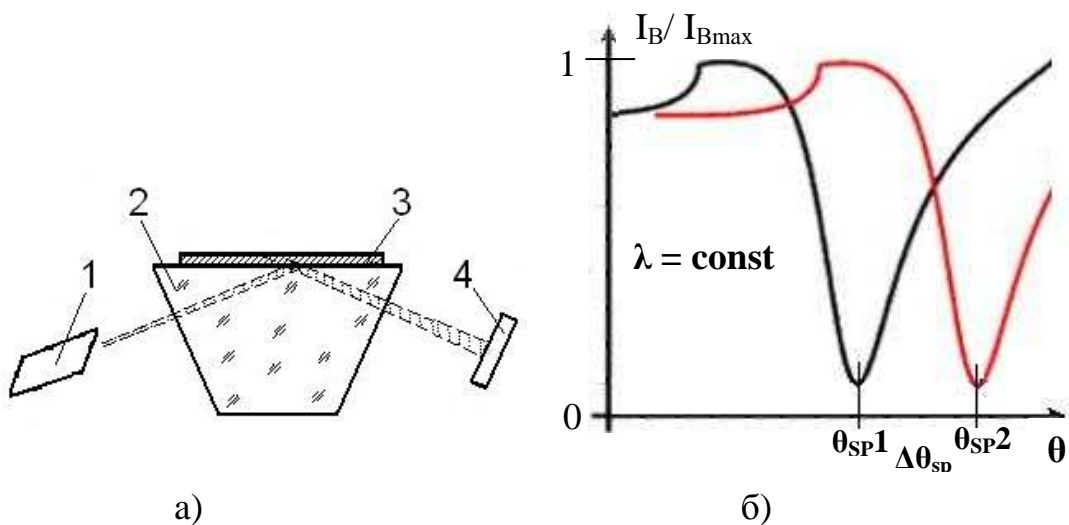


Рис. 3.1. Оптична схема ППР-приладу з геометрією Кречмана (а) та залежність інтенсивності відбитого світла від кута падіння на ЧЕ (б).

Найбільш поширеним джерелом збудження поверхневих плазмонів є лазери. Характеристика відбиття $R(\theta)$ – це залежність інтенсивності відбитого світла лазера I_B від кута падіння цього світла θ на поверхню ЧЕ в діапазоні кутів, більших за кут ПВВ на межі поділу середовищ чутливий елемент-аналіт (Рис.3.1,б). Значення ПЗ аналіту пов'язане зі значенням

мінімуму характеристики відбиття θ_{sp} через такі параметри елементів оптичної схеми приладу, як довжина хвилі лазера та показники заломлення чутливого елементу, призми ПВВ та аналіту. В якості плазмоносійного шару чутливого елементу для переважно використовують золото чи срібло.

Якщо металева плівка чутливого елементу достатньо тонка (< 200 нм), то значна частина загасаючої в металі електромагнітної хвилі досягає протилежної поверхні цієї плівки. Тоді ППР стає чутливим до властивостей того середовища, котре контактує з металом. Від електричної поляризації цього середовища, тобто від його діелектричної постійної (яка в діелектриках рівна квадрату показника заломлення світла), залежить положення мінімуму характеристики відбиття.

При зміні властивостей металічної плівки чи показника заломлення розташованого над плівкою середовища мінімум характеристики відбиття помітно зсувається. Тому спочатку вимірювання кривих ППР розглядалось тільки як дуже чутливий метод вивчення оптичних властивостей і стану поверхонь металів, оптичних характеристик металічних плівок. Згодом використовували як один з найточніших методів рефрактометрії, тобто визначення показників заломлення рідин і газів. Саме завдячуючи останньому метод ППР почали використовувати для визначення концентрації в рідинах розчинених речовин, які дещо змінюють показники заломлення світла в рідких розчинниках.

Характеристику відбиття при ППР можна спостерігати в одному з двох режимів. Якщо при постійному куті падіння опромінювати металічну плівку світлом широкого діапазону хвиль, то, розклавши відбите світло в спектр, буде спостерігатись ППР, як резонансний мінімум в розподіленні спектральної інтенсивності відбитого світла (Рис. 3.2.а) [1]. По горизонтальній вісі відкладені значення хвильового числа k в см^{-1} , по вертикальній вісі – коефіцієнт відбиття R . Чутливість визначення змін

показника заломлення в цьому випадку визначається мінімальним спектральним зсувом мінімуму ППР, який можна зареєструвати.

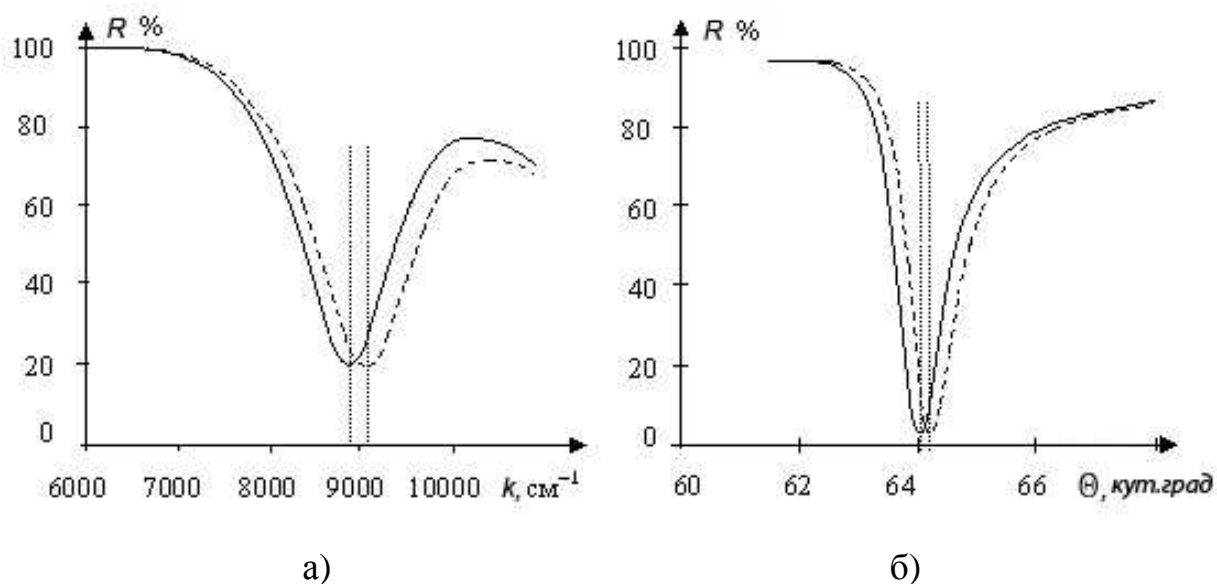


Рис. 3.2. Режими спостереження характеристики відбиття при ППР

Якщо застосовувати монохромне опромінення металічної плівки, то спостерігається резонансний мінімум в кутовій залежності інтенсивності відбиття (Рис. 3.2.б). Чутливість визначення змін у цьому випадку визначається найменшим кутовим зсувом мінімуму характеристики відбиття, який можна зареєструвати. В обох випадках на суцільною лінією показана характеристика відбиття при відсутності, а штриховою лінією – при наявності діелектричного шару на золотій плівці (Рис. 3.2). Мінімуми відбиття відмічені пунктирними лініями.

На відміну від рефрактометрів, котрі вимірюють зміну показника тільки в об'ємі досліджуваної речовини, ППР-прилади «відчують» зміну показника заломлення на поверхні, в той час як в об'ємі зміни відсутні.

Таким чином зміна показника заломлення досліджуваного середовища, котра була викликана хімічною, біологічною реакцією чи зміною концентрації аналіту, створює пропорційний кутовий зсув мінімуму характеристики відбиття внаслідок зміни частоти поверхневого плазмону.

Виміряне значення кутового чи спектрального зсуву мінімуму може бути перераховане у відповідну зміну показника заломлення.

В ППР-приладах для вимірювання зміни показника заломлення досліджуваного середовища (аналіта) поверхневий плазмон збуджується на кордоні розділу між цим середовищем та металевою плівкою чутливого елементу. Зміна показника заломлення середовища викликає зміну постійної поширення поверхневого плазмона, що приводить до зміни стану резонансного з'єднання між електромагнітною хвилею та поверхневим плазмоном, яку можна спостерігати як зміну одного з параметрів випромінювання [2]. В залежності від того який параметр електромагнітної хвилі вимірюється ППР-прилади можуть бути класифіковані на прилади з кутовим скануванням, спектральним скануванням, вимірюванням інтенсивності, фази або поляризації випромінювання.

В приладах з кутовим скануванням монохроматична електромагнітна хвиля збуджує поверхневий плазмон в певному діапазоні кутів падіння на межі середовищ чутливий елемент-аналіт. Падаюча хвиля передає енергію фотонів електронам в металевій плівці, при цьому спостерігається мінімум інтенсивності відбитої хвилі (рис. 3.3, а) [3]. Вихідний сигнал сенсора може бути відкалібрований в значеннях показника заломлення. В ППР-приладах зі скануванням спектру поверхневий плазмон збуджується колімованою світловою хвилею, що містить кілька довжин хвиль.

Кут, під яким світлова хвиля падає на металеву плівку підтримують постійним. Сила зчеплення між падаючою хвилею і поверхневим плазмоном спостерігається при різних довжинах хвиль, а значення довжини хвилі якій відповідає найефективніша передача енергії фотонів та спостерігається мінімум інтенсивності відбитої хвилі використовується в якості вихідного сигналу сенсора (рис. 3.3, б) [4].

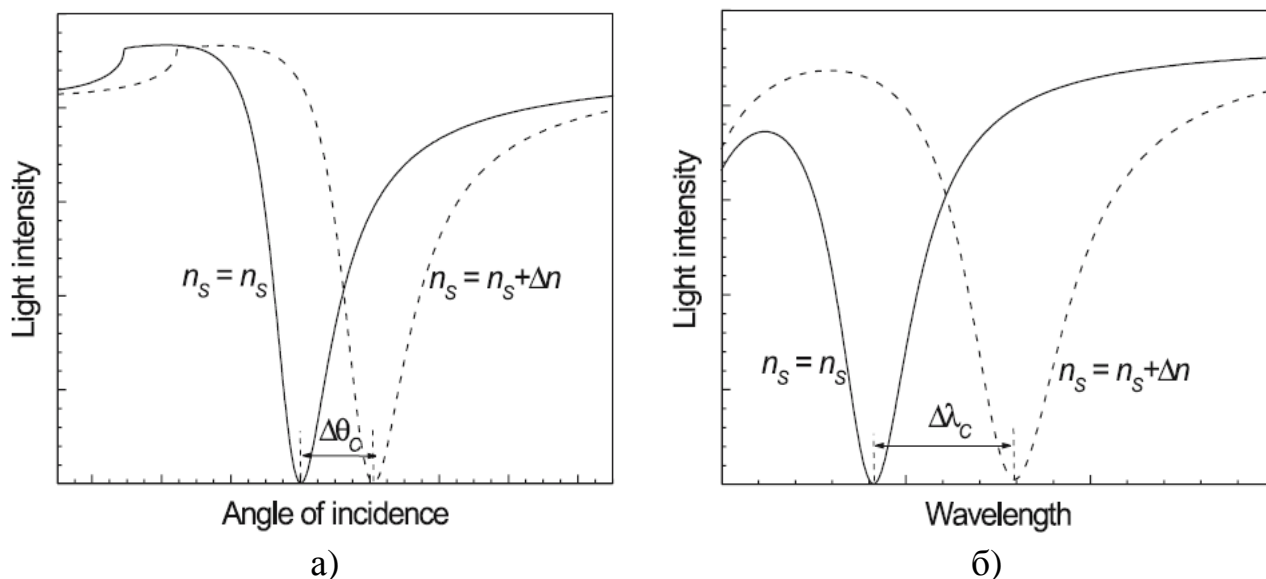


Рис. 3.3. Кутові (а) та спектральні (б) залежності інтенсивності відбитого світла від межі чутливий елемент-аналіт до (—) та після (---) зміни показника заломлення аналіту на величину Δn [3].

Вихідний сигнал сенсора може бути відкалібрований в значеннях показника заломлення. В ППР-приладах зі скануванням спектру поверхневий плазмон збуджується колімованою світловою хвилею, що містить кілька довжин хвиль. Кут, під яким світлова хвиля падає на металеву плівку підтримують постійним. Сила зчеплення між падаючою хвилею і поверхневим плазмоном спостерігається при різних довжинах хвиль, а значення довжини хвилі якій відповідає найефективніша передача енергії фотонів та спостерігається мінімум інтенсивності відбитої хвилі використовується в якості вихідного сигналу сенсора (рис. 3.3, б) [4].

ППР-прилади в яких вимірюється зміна інтенсивності відбитого світла (Рис.3.4, а) працюють при постійному куті падіння і постійній довжині хвилі електромагнітного випромінювання, що збуджує поверхневий плазмон [5]. У приладах котрі визначають зсув фази [6] (Рис.3.4, б) та зміну поляризації [7] світлової хвилі вимірювання виконують при сталих куті падіння і довжині хвилі [8].

Вище наведені вимірювані характеристики залежать від константи розповсюдження поверхневого плазмону. Причиною зміни константи

розповсюдження в біосенсорах є зміни показника заломлення аналіту внаслідок процесу з'єднання рецептора зі спорідненим до нього аналітом (утворення компліментарної пари). Коли розчин, що містить молекули аналіту контактує з чутливим елементом ППР-сенсора, молекули аналіту в розчині зв'язуються з рецепторами, що збільшує показник заломлення на поверхні чутливого елементу.

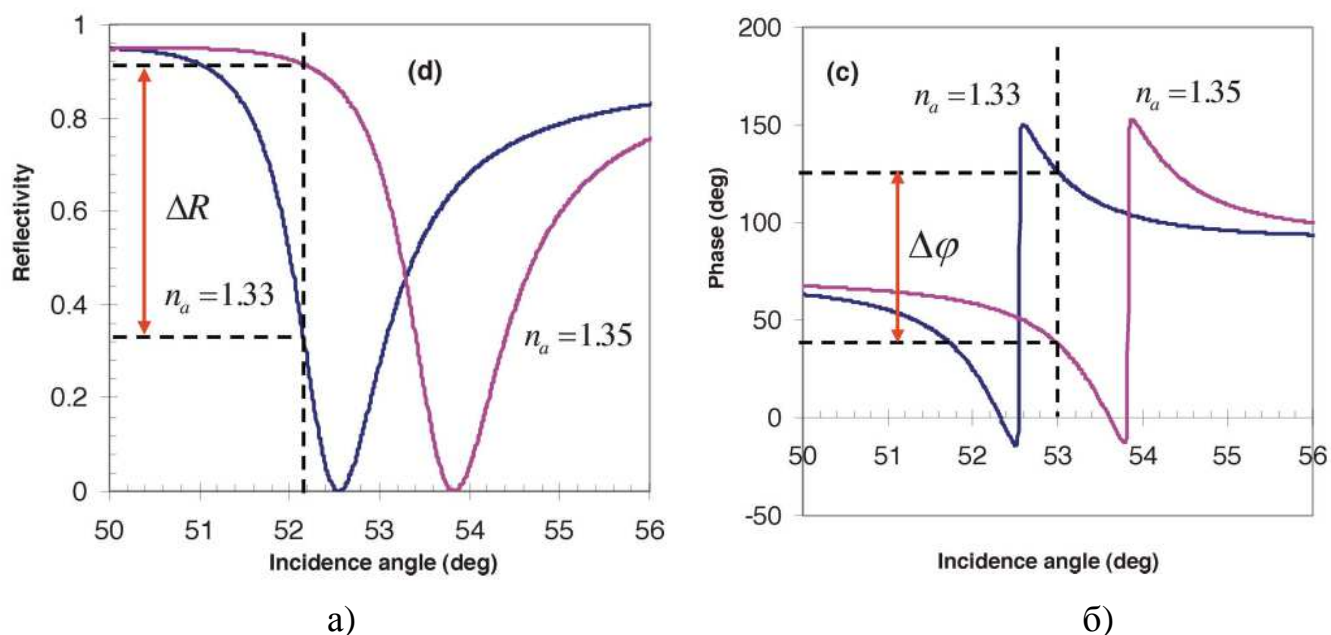


Рис. 3.4. Кутові залежності інтенсивності відбитого світла від межі чутливий елемент-аналіт при вимірюванні зміни інтенсивності відбиття (а) та зміни фази (б) до (—) та після (---) зміни показника заломлення аналіту Δn [8].

Інтегральна зміна показника заломлення Δn_b молекул аналіту, що зв'язалися з рецептором залежить від приросту об'ємного індексу рефракції $(dn/dc)_{vol}$ і може бути виражена як [9]:

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{vol} \Delta c_b, \quad (3.1)$$

Де, Δc_b – концентрація пов'язаного аналіту, г/мл.

Значення об'ємного індексу рефракції залежить від структури молекул аналіту і варіюється від 0,1 до 0,3 мл/г [10]. Якщо зв'язування рецептору з аналітом відбувається в тонкому шарі на поверхні чутливого елементу з

товщиною шару h , то інтегральна зміна показника заломлення може бути виражена у вигляді:

$$\Delta n_b = \left(\frac{dn}{dc} \right)_{\text{vol}} \frac{\Delta \Gamma}{h}, \quad (3.2)$$

Де, Γ – поверхнева концентрація, мг/мм² [11].

Оскільки зміна показника заломлення залежить від поверхневої концентрації аналіту та товщини шару взаємодії аналіту з рецептором, то напрямком підвищення рівня відгуку сенсора на біологічну реакцію є створення технології утворення тонких однорідних шарів рецепторів, що підвищить чутливість ППР-приладів.

Методи реєстрації біомолекулярних взаємодій на основі плазмонного резонансу використовують вимір точної позиції кута плазмонного резонансу в приладах з монохроматичним променем [12-14] – Biacore (Швеція), ТИСПР (США), BIOSUPLAR (Німеччина), Nano-spr (США) або вимір довжини хвилі, що відповідає плазмонному збудженню при використанні джерела білого світла [15, 16]. Останнім часом не зменшується кількість спроб залучити інші фізичні ефекти - поляризацію падаючого променя [17, 18] хвильоводне розповсюдження світла [19, 20], залучення додаткових шарів на поверхні металу-носія плазмонного збудження [21, 22]. У роботі [21] застосована кремнієва пластина в якості призми і досліджена можливість реєстрації парів летких речовин по зміні показника заломлення тонкого шару хроматографічної фази на поверхні золота. Автори [22] заявили про можливість застосування оптичних хвильоводів з напиленим шаром срібла і двоокису цирконію на його поверхні для реєстрації зміни показника заломлення зовнішнього середовища, однак дані цієї роботи свідчать про низьку чутливість методу, хоча зручності оптичних світловодів при контролі водяного середовища незаперечні. Застосування срібла в цьому випадку здається недостатньо обґрунтованим, оскільки саме у водяних середовищах срібло не є стабільним.

Біосенсор, описаний у [23] працює на базі поверхневого плазмонного резонансу. Світло в біосенсорі проходить через стан повного внутрішнього відбиття від внутрішньої поверхні прозорого блоку. На поверхню прозорого блоку, що відбиває світло, нанесений шар срібла товщиною 45-60 нм, що є робочим елементом біосенсору.

Біосенсор реєструє зміну показника заломлення шару досліджуваного матеріалу, нанесеного на шар срібла, що є робочим елементом. Це стає можливим при створенні умов виникнення резонансу поверхневих плазмонів при повному внутрішньому відбитті світла. Для цієї мети змінюють кут падіння променя лазера на внутрішню поверхню прозорого блоку. Крива поверхневого плазмонного резонансу для срібла у якості робочого елементу, характеризується малою напівшириною, що дозволяє з високою точністю визначати положення мінімуму резонансної кривої математичними методами. Недоліками використання срібла як робочого елемента біосенсора є те, що воно зберігає свої властивості нетривалий час внаслідок окислення, а також його недостатня чутливість до зміни показника заломлення світла в досліджуваному матеріалі, нанесеному на шар срібла.

Також відомий оптичний сенсор [24] який містить детектор поверхневого плазмонного резонансу, робочий елемент якого виконаний у вигляді призми повного внутрішнього відбиття з нанесеною на неї плівкою золота товщиною 45-60 нм. Ця товщина обумовлена фізичними умовами збудження плазмонів у металевих плівках. В оптичному сенсорі використовується поверхневий плазмонний резонанс для виявлення специфічного матеріалу, наприклад, антигену у крові. Розбіжний світловий пучок зазнає внутрішнього відбиття від поверхні призми, покритої плівкою золота і реєструється фотодетектором. Діелектричні властивості досліджуваного матеріалу, що примикає до плівки золота, визначають кут відбиття, при якому в результаті поверхневого плазмонного резонансу інтенсивність відбитого світла зменшується.

Золото, як робочий елемент детектора поверхневого плазмонного резонансу, забезпечує високу чутливість до зміни діелектричних властивостей досліджуваного матеріалу, що примикає до плівки, і має високу стабільність.

Недоліком цього детектора є відносно велика напівширина резонансної кривої, що зменшує точність визначення мінімуму апроксимацією характеристики відбиття поблизу мінімуму.

Відомі сенсори для детектування і визначення концентрації біомолекул і молекулярних комплексів у рідкій аналізованій речовині [25, 26]. У цих сенсорах відбувається опромінення межі розподілу між скляною призмою (оптично більш щільним середовищем) і досліджуваним розчином (оптично менш щільним середовищем) з боку більш щільного середовища; вимір випромінювання, відбитого від шару, у якому збуджується поверхневий плазмонний резонанс; детектування і визначення концентрації аналізованої речовини по зміні інтенсивності відбитого світла при фіксованому куті падіння. У цьому сенсорі використано джерело збуджувального світла, що працює в інфрачервоному діапазоні хвиль.

Два вищезгаданих сенсори для детектування і визначення концентрації хімічних речовин, біомолекул і молекулярних комплексів використовують для отримання експериментальних даних - вимірювання зміни кута мінімуму поверхневого плазмонного резонансу чи інтенсивності відбитого світла при постійному куті падіння. При цьому можливі помилки, обумовлені впливом вищенаведених шкідливих факторів, наприклад, зміною показника заломлення аналізованого середовища внаслідок коливань температури зовнішнього середовища. Ці помилки важко знайти на стадії вимірів, що знижує надійність і вірогідність одержуваної інформації.

3.2. Чутливість, роздільна здатність та точність приладу

У ППР-сенсорах з прямим перетворенням (рефрактометричних), показник заломлення аналіту безпосередньо змінює характеристики світлової хвилі, такі як кут і довжина хвилі збудження ППР, інтенсивність, фаза і поляризація випромінювання (рис. 3.5, а). У ППР-біосенсорах, котрі вимірюють зазвичай концентрацію хімічних або біологічних аналітів, сигнал через зв'язування аналіту в елементі біорозпізнавання перетворюється в зміни показника заломлення на поверхні датчика, який потім модулює характеристики світлової хвилі.

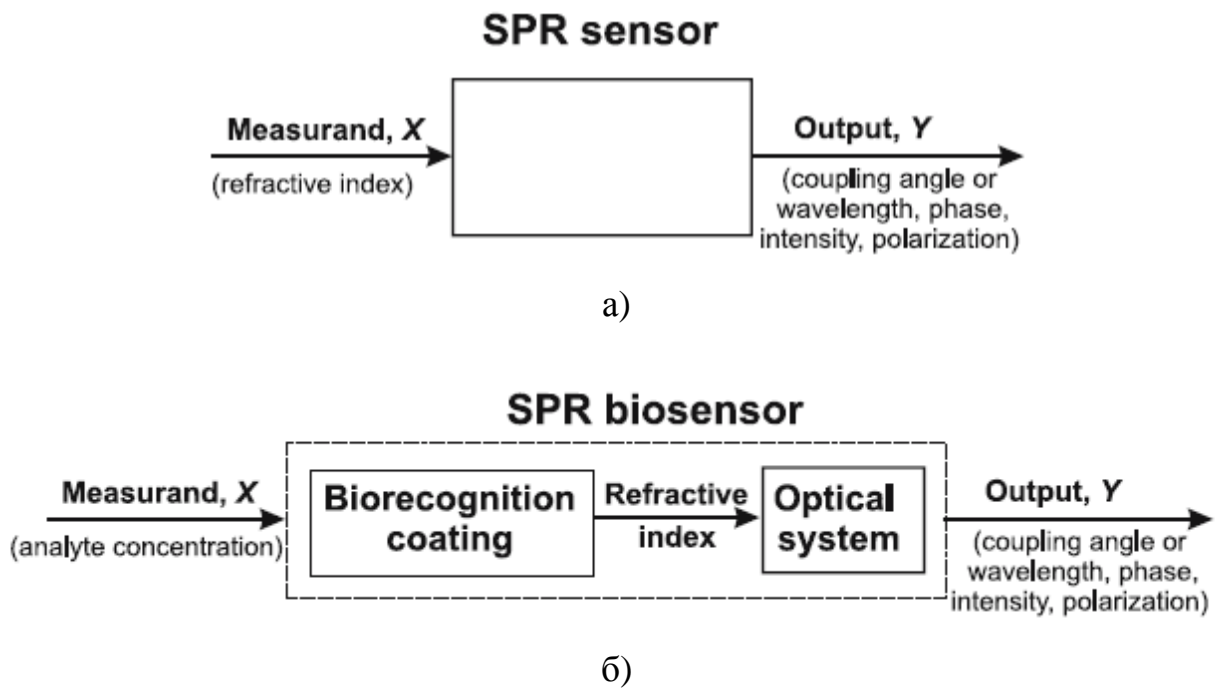


Рис. 3.5. Схема вимірювання для прямого перетворення вхідного сигналу (а) та для непрямого перетворення (б) [9].

Основними характеристиками ППР-приладів є чутливість, роздільна здатність, точність вимірювання і динамічний діапазон. Далі буде розглянуто кожен з тих характеристик.

Чутливість приладів

Чутливість ППР-приладів з призмовим збудженням за схемою Кречмана в конфігурації сканування кута з механічною розгорткою (у газподібному і рідкому середовищах) при фіксованій довжині хвилі визначається як відношення між зсувом кута мінімуму характеристики відбиття (резонансного кута) $\Delta\theta_{\min}$ та зміною ПЗ аналіту ΔN_a (3.3), котра викликала цей кутовий зсув [8]. Формула (3.3) визначає чутливість в режимі вимірювання Multiple. В режимі вимірювання Slope вираз чутливості приймає інший вигляд (3.4). Важливим параметром вимірювальної системи є також межа детектування, котра визначається такою мінімальною зміною показника заломлення аналіту $\Delta N_{a\min}$ (або відповідною його концентрацією), котра може бути визначена ППР-приладом. Відомо також, що межа детектування визначається величиною чутливості ППР-приладу і рівнем шуму χ його інформативного параметру (3.5), яким є зміна кута мінімуму $\Delta\theta_{\min}$ або зміна інтенсивності відбитого від поверхні ЧЕ світла ΔI_B (зміна коефіцієнта відбиття ΔR), що визначається режимом роботи приладу.

$$S_{\theta} = \frac{\Delta\theta_{\min}}{\Delta N_a} \quad (3.3)$$

Де, S_{θ} – чутливість приладу в режимі вимірювання Multiple;

$\Delta\theta_{\min}$ – зсув кута мінімуму характеристики відбиття;

ΔN_a – зміна ПЗ аналіту.

$$S_R = \frac{\Delta R}{\Delta N_a} \quad (3.4)$$

Де, S_R – чутливість приладу в режимі вимірювання Slope;

ΔR – зміна коефіцієнту відбиття при зміні показника заломлення ΔN_a .

Для аналізу чутливості за формою графіку залежності відбиття $R(\theta)$ від резонансного кута θ достатньо визначити крутизну нахилу її лівого схилу (3.6). У цьому випадку зв'язок між параметрами чутливості виражається співвідношенням (3.7).

$$\Delta N_{aMIN} = \frac{\chi_{\theta}}{S_{\theta}} \quad (3.5)$$

Де, ΔN_{aMIN} – мінімальна зміна показника заломлення аналіту, котру можливо виміряти аналітичним приладом – межа детектування приладу;

χ_{θ} – рівень шуму базової лінії вимірюного сигналу.

$$S_s = \frac{\Delta R}{\Delta \theta_{\min}} \quad (3.6)$$

Де, S_s – д крутизна нахилу лівого схилу графіку залежності відбиття $R(\theta)$.

$$S_R = S_{\theta} \cdot S_s \quad (3.7)$$

Виробники приладів ППР для оцінки межі детектування використовують значення зсуву мінімуму кривої ППР у відносних кутових величинах RU ($RU = 8.3 \times 10^{-5}$ кутових градуса, що еквівалентно адсорбції одного пікограму речовини на поверхні ЧЕ площею 1 мм^2), котра була введена в обіг шведською фірмою BIACORE (Швеція). Інші виробники та дослідники вимірюють межу детектування в абсолютних значеннях ПЗ RIU (refractive index unit). Причому зміна кута пропорційна концентрації аналіту в аналізованому об'ємі. Тому в рідинах ЧЕ реагує тільки на зміну ПЗ і поглинання аналіту. У газовому середовищі спостерігається адсорбція складових аналіту на поверхні ЧЕ, що призводить до підвищення концентрації в приповерхневій зоні ЧЕ в порівнянні з об'ємом. Тому ЧЕ реагує як на зміну ПЗ і поглинання аналіту, так і на товщину адсорбованого шару на поверхні ЧЕ. Величина адсорбції залежить від матеріалу та

властивостей поверхні (шорсткості і пористості). Збільшення пористості поверхні чутливого елементу дозволяє збільшити відгук ЧЕ за рахунок збільшення площі ефективної поверхні взаємодії з аналітом. Чутливість ППР-приладів також визначається шириною і формою резонансної кривої. Тому напрямок значного підвищення (на порядки) чутливості полягає в застосуванні способів звуження кривої ППР. Це досягається розміщенням в приповерхневій області ЧЕ дифракційних і голографічних структур [27]. Звуження резонансного спектру також можливе шляхом застосування біметалічних шарів срібло-золото на поверхні ЧЕ [28] і збільшення довжини хвилі лазерного випромінювання [29].

Роздільна здатність приладів

Роздільна здатність визначається межею детектування, котра в свою чергу визначається рівнем шумової доріжки вимірюваного сигналу. Тому треба визначити основні джерела шуму, котрі мають місце в приладі. Основним інформативним сигналом є інтенсивність відбитого світла в мінімумі резонансної кривої, тому рівень шумової доріжки визначається саме шумом в сигналі інтенсивності відбитого світла. Світло, проходячи крізь елементи оптичної схеми приладу, збільшує шумову складову внаслідок коливань оптичних та геометричних параметрів цих елементів. Розглянемо складові елементи оптичної схеми, які мають найбільший вплив на рівень шуму вимірюваного сигналу. Такими елементами є джерело збудження поверхневих плазмонів в тонкій металевій плівці та фотоприймачі, котрі вимірюють інтенсивність відбитого світла.

Джерелом світла є напівпровідниковий лазерний діод, а параметрами, котрі визначають рівень шуму, є коливання інтенсивності та довжини хвилі випромінювання, яке залежать від величини струму через випромінюючий кристал лазерного діоду та геометричних розмірів його оптичного резонатора [30]. Як у будь-якому напівпровіднику, рівень струму при постійній напрузі

живлення визначається температурою кристалу, підвищення якої збільшує кількість неосновних носіїв струму, і, як результат, зростає загальний струм. Збільшення температури впливає на геометричні розміри резонатора внаслідок об'ємного розширення, що викликає зміну довжини хвилі і при подальшому зростанні струму призводить до зриву генерації: лазер втрачає когерентність.

Фотоприймачем є напівпровідниковий кремнієвий фотодіод. Шуми фотоприймача пов'язані з випадковими флуктуаціями його провідності і мають три складові, визначені механізмами виникнення флуктуацій: тепловий шум, дробовий шум та генераційно-рекомбінаційний шум [31]. Рівень теплового шуму пропорційний температурі напівпровідника (3.8). Дробовий шум пропорційний струму через напівпровідник. Генераційно-рекомбінаційний шум пропорційний швидкості утворення неосновних носіїв заряду в напівпровіднику, котра збільшується зі зростанням температури.

$$\overline{U_T^2} = 4 \cdot k \cdot T \cdot R \cdot \Delta f \quad (3.8)$$

де, $\overline{U_T^2}$ – середньоквадратичне значення напруги теплового шуму, В;
 k – стала Больцмана;
 T – абсолютна температура напівпровідника, К;
 R – опір напівпровідника при температурі T , Ом;
 Δf – смуга частот вимірюваного сигналу, Гц.

Крім того, генерування випромінювання в таких лазерах можливо за умови, що струм через р-п перехід не перевищує максимально допустимий [32, 33]. При збільшенні температури пороговий струм зростає, що викликає зменшення інтенсивності випромінювання. Якщо струм через р-п перехід інжекційного лазера стає більшим за пороговий, генерація випромінювання припиняється.

Таким чином, аналіз основних джерел шуму показав, що причиною шуму є збільшення температури, тобто температурний фактор. Тому одним зі шляхів зниження межі детектування є зменшення шумів за рахунок конструкторсько-технологічних рішень.

Точність вимірювання приладів

Відгук сенсора Y до даного значення вимірюваної величини X може бути представлено через передаточну функцію F , $Y = F(X)$, яка визначається з теоретичної моделі сенсора або за результатами його калібрування. Проте, значення вимірюваної величини $X_{\text{вим}}$ відрізняється від істинного значення X_0 на величину похибки вимірювання.

Похибки результату вимірювання є наслідком дії багатьох причин, котрі супроводжують процес вимірювання. За джерелом виникнення розрізняють три групи причин і відповідно три комплексні складові похибки вимірювання: методичну, інструментальну і похибку зчитування результату [34]. Також похибки класифікуються за умовами проведення вимірювання та характером проявлення: основні, додаткові, систематичні та випадкові [35].

Методична похибка викликана недоліками методу вимірювання і прийомів використання засобів вимірювання. Для непрямих вимірювань методичні похибки викликані закономірностями, котрі пов'язують виміряні величини та постійні параметри з кінцевим результатом вимірювання, отриманим непрямым шляхом. Прилади з призмовим методом збудження автоматично визначають абсолютне значення показника заломлення аналіту N_a та його відносну зміну ΔN_a через виміряні параметри характеристики відбиття як кутове положення мінімуму θ_{\min} , інтенсивність відбитого світла в мінімумі R_{\min} , напівширина характеристики відбиття та ін. Постійними параметрами для перерахунку θ_{\min} та $\Delta \theta_{\min}$ в значення N_a та ΔN_a є показник заломлення ретропризми N_p , оптичні константи сенсора n_M , k_M та d_M і довжина хвилі лазера λ .

Інструментальна похибка викликана відхиленням оптичних та геометричних параметрів елементів конструкції приладу. Для ППР-приладу такими похибками є: відхилення розмірів деталей оптичної схеми приладу, відхилення довжини хвилі лазера від номінального значення, відхилення показників заломлення оптичної схеми приладу від номінальних значень. Побудова характеристики відбиття виконується зміною кута падіння або довжини хвилі лазерного випромінювання збуджуючого ППР з певним кроком та вимірюванні при цьому інтенсивності відбитого від чутливого елементу випромінювання. До складових інструментальної похибки слід віднести похибку положення механізму виконуючого сканування по куту чи по довжині хвилі (обертання призми ПВВ чи монохроматора). Ця похибка може зростати в процесі експлуатації ППР пристрою внаслідок зносу деталей обертаючого механізму та теплового розширення елементів його конструкції.

Похибка зчитування результату має дві складові: похибка аналого-цифрового перетворення виміряного значення інтенсивності відбитого від сенсору світла і похибка визначення кутового положення мінімуму характеристики відбиття. Похибка визначення мінімуму характеристики відбиття може бути зменшена шляхом математичної обробки результатів вимірювання [36].

Додаткові похибки пов'язані з відхиленням характеристик складових елементів, а саме з температурною залежністю параметрів елементів оптичної схеми, зокрема показників заломлення та довжини хвилі напівпровідникового лазера, що створює температурний дрейф положення мінімуму характеристики відбиття [37].

Аналіз конструкції та режимів роботи приладу з кутовим скануванням показав, що основними конструкторсько-технологічними факторами, котрі впливають на природу та величину основних похибок результату вимірювання та функцію перетворення є: конструкція сенсора та технологія його виготовлення, температурний режим роботи приладу, довжина хвилі

збудження, швидкість прокачування аналіту через вимірювальну кювету, параметри кінематичної схеми приладу та процес математичної обробки результатів вимірювання. Додаткові похибки вимірювання викликані стохастичними процесами: міжфазними флуктуаціями через випадкові процеси адсорбції-десорбції на границі розділу сенсор - аналіт, ефекти через мікроскопічні повітряні пухирці на поверхні сенсора, завади мережі живлення приладу, електромагнітні завади, ефекти тертя-ковзання в кінематичній схемі тощо. Таким чином, загальну похибку вимірювання показника заломлення аналіту можна представити відомою залежністю (3.9) для суми адитивних абсолютних похибок вимірювання [34].

$$\delta N = \sqrt{(\delta N_{\lambda}^2 + \delta N_T^2 + \delta N_p^2 + \delta N_{\text{КС}}^2 + \delta N_{\text{П}}^2 + \delta N_{\text{ДП}}^2)} \quad (3.9)$$

де, δN_{λ} – абсолютна похибка викликана конструкцією ЧЕ;

δN_T – абсолютна температурна похибка;

δN_{λ} – абсолютна похибка апроксимації характеристики $R(\theta)$;

δN_p – абсолютна похибка викликана зміною тиску аналіту;

$\delta N_{\text{КС}}$ – абсолютна похибка кроку сканування по куту;

$\delta N_{\text{П}}$ – абсолютна похибка викликана конструкцією оптичної схеми;

$\delta N_{\text{ДП}}$ – додаткові абсолютні похибки.

Загальна абсолютна похибка вимірювання ПЗ аналіту представлена сумою п'яти абсолютних похибок, кожна з яких визначається відповідними конструкторсько-технологічними чинниками, а саме:

-абсолютна похибка апроксимації характеристики $R(\theta)$ визначається довжиною хвилі випромінювання лазера;

-абсолютна похибка кроку сканування по куту визначається геометричними розмірами елементів передачі руху редуктора та похибкою кроку крокового двигуна кінематичної схеми приладу;

-абсолютна температурна похибка визначається температурним режимом роботи приладу;

- абсолютна похибка викликана конструкцією ЧЕ визначається товщиною та мікрошорсткістю поверхні металевого шару ЧЕ.

Додаткові похибки вимірювання ПЗ викликані стохастичними процесами: швидкістю прокачування аналіту через вимірювальну кювету, міжфазними флуктуаціями через випадкові процеси адсорбції-десорбції на границі розділу ЧЕ - аналіт, ефекти через мікроскопічні повітряні пухирці на поверхні ЧЕ, завади мережі живлення приладу, електромагнітні завади, ефекти тертя-ковзання в кінематичній схемі, механічні вібрації, тощо.

Вплив додаткових похибок мінімізований конструкцією приладу і використанням додаткового устаткування під час вимірювання. Так для ППР-приладу серії «Плазмон» прокачування аналіту через вимірювальну кювету виконується 8-ми канальним перистальтичним мікронасосом, розробленим в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Швидкість прокачування обирається в межах $(5...20) \pm 1$ мкл/хв і підтримується сталою, що забезпечує мінімальний вплив на ПЗ аналіту зміни його тиску під час прокачування через вимірювальну кювету. Механічні вібрації зменшені за рахунок наявності демпферів між елементами кінематичної схеми та корпусом приладу, а також наявності демпферів, на які ставиться прилад. Тому величина сумарної додаткової абсолютної похибки не перевищуватиме 10% від загальної похибки вимірювання.

Враховуючи значну кількість похибок вимірювання та їх різноманітність, наступні розділи книги присвячені методам зменшення абсолютних похибок вимірювання та підвищення чутливості ППР-приладів з призмовим методом збудження та механічною розгорткою кутового сканування.

РОЗДІЛ 4

НАПРЯМКИ ВДОСКОНАЛЕННЯ ПРИЛАДІВ

4.1. Характеристика існуючих конструкцій приладів

Вже понад два десятиліття виробництво сенсорів аналітичних приладів на поверхневому плазмонному резонансі представляє собою сформовану технологію. Однак, нещодавні дослідження показують подальше підвищення їх чутливості та зниження межі детектування. Так за 25 років виробникам ППР-приладів вдалось знизити межу детектування в 200 разів (рис.4.1). В більшості випадків підвищення чутливості пов'язане зі збільшенням напруженості електромагнітного поля на поверхні чутливого елемента. Іншими важливими механізмами підвищення чутливості є взаємодії між плазмонами та екситонами, між молекулами аналіту і поверхнею металу. Межу детектування можна значно знизити шляхом використання систем з великим значенням відношення сигнал/шум як інтерферометрія зі спільним шляхом, еліпсометрія чи поляриметрія.

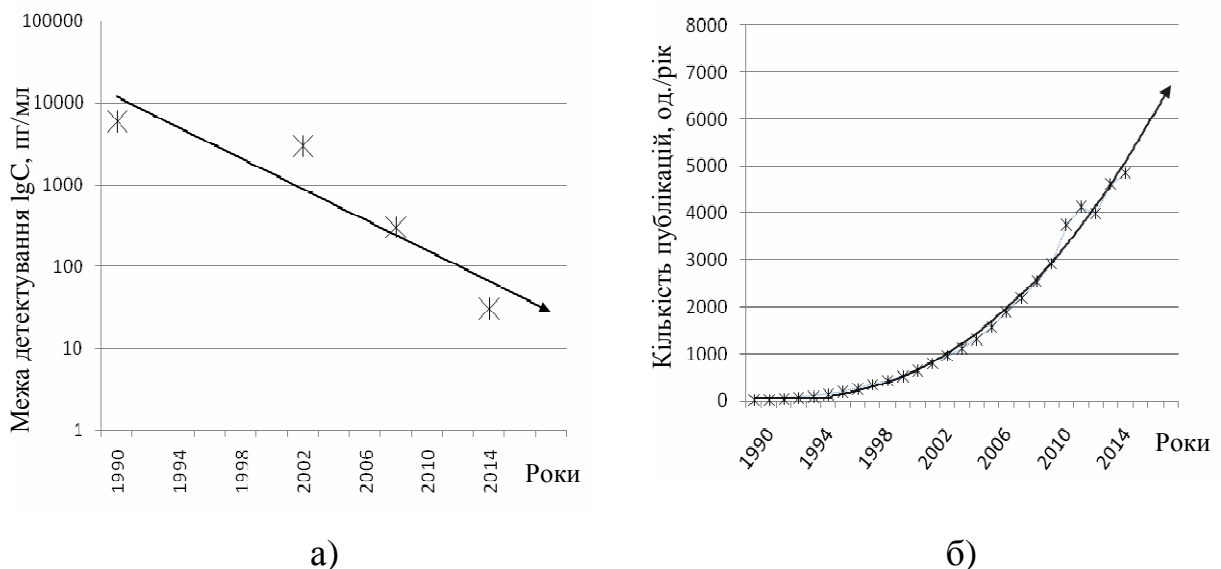


Рис.4.1. Еволюція межі детектування аналіту (а) та кількості публікацій по тематиці ППР-сенсорів (б) за останні 25 років.

Враховуючи зростання за експонентою кількості публікацій за цей період проведення подальших досліджень у цьому напрямку є актуальним.

В останні десятиліття спостерігається величезне зростання в розвитку чутливих пристроїв на ППР [1, 2] як з фундаментальної точки зору, так і високочутливих пристроїв для оптичного визначення малих біологічних чи хімічних об'єктів у газах та рідинах [3].

ППР-прилади застосовуються в різноманітних сферах діяльності, у тому числі молекулярному розпізнаванні, виявленні імунологічних захворювань, та інших [4-10]. Біосенсиори більш чутливі ніж багато інших пристроїв того ж застосування, вони ще не в змозі досягти прямого виявлення малих молекулярних взаємодій (кілька сотень Дальтон), або низькомолекулярних концентрацій (фізіологічні концентрації) на поверхні біосенсора. Крім того, були запропоновані різні ЛППР-біосенсиори з межею виявлення поверхневої маси $100\text{-}1000\text{ pg/mm}^2$, котра у 100 разів вища, ніж у ППР-приладів [17-19]. Тому провідні фірми виробники ППР-приладів та наукова спільнота вдосконалюють як технологію отримання чутливого елементу ППР-сенсору, так і методи модифікації (функціоналізації) поверхні чутливого елементу для підвищення як чутливості приладів так і точності вимірювання хімічних та біологічних реакцій.

4.2. Вдосконалення технології виготовлення та конструкції чутливого елемента приладів

На практиці реєстрація ППР здійснюється шляхом виміру енергетичних співвідношень між амплітудою падаючого і відбитого світла. Зокрема, найважливішим результатом вимірів є точність визначення мінімуму відбиття електромагнітної хвилі шляхом зміни кута падіння світла або його довжини хвилі. Тому є очевидним, що вузька крива ППР може бути зафіксована з більшою точністю, ніж широка. З іншого боку, відгук вузької лінії на зовнішній вплив є слабкішим [20]. У цьому випадку з погляду

створення аналітичних приладів важливо проаналізувати вплив типу матеріалу ЧЕ на параметри кривої ППР. На практиці переважно використовують золото і срібло. Мідь і алюміній практично не використовуються: мідь через високу окисну здатність, алюміній - через дуже високе значення уявної частини діелектричної проникності ε_i , що суттєво розширює криву ППР. У роботах [21-23] проаналізоване питання про оптимальний вибір металу і довжини хвилі збуджуючого світла з погляду досягнення максимальної чутливості і хімічної інертності робочої поверхні ЧЕ. Відомо, що застосування срібних плівок дає можливість одержати найвужчий у порівнянні з іншими металами ППР спектр, що відповідає максимальній чутливості ППР-сенсора. Однак золота робоча поверхня ЧЕ має тенденцію до більшої стабільності і меншої схильності до хімічного впливу. Тому найбільш широке розповсюдження одержали перетворювачі, що використовують плівку золота як носія поверхневих плазмонів.

Дослідження властивостей тонких металевих плівок почалися ще до початку використання явища ППР в сенсориці. В роботах досліджувалась залежність структури плівок, їх фізико-хімічних [24-27] та оптичних [28-30] властивостей від технології виготовлення. В роботах [31, 32] проаналізовано вплив морфології тонких металевих плівок однакової товщини на спектри їх пропускання та діелектричні константи. Зміна стану поверхні плівок при їх виготовленні суттєво впливає на формування наступних шарів [33].

Важливим фактором є вплив рельєфу поверхні золотої плівки на поглинання енергії світла внаслідок наявності сильного електричного поля саме на її поверхні. Тому поверхнева шорсткість металу суттєво впливає на розповсюдження поверхневих плазмонів та призводить, внаслідок розсіяння енергії, до передчасного загасання плазмонів та зменшення їх фазової швидкості [34-37]. При цьому змінюється форма дисперсійної кривої та виникає зсув резонансної частоти поверхневого плазмону. При фіксованій довжині хвилі падаючого світла зі зростанням шорсткості поверхні ЧЕ

позиція мінімуму кривої ППР зміщується в сторону більших кутів, а величина відбиття в мінімумі резонансу (R_{\min}) збільшується.

Слід також відмітити, що реальні металеві плівки завжди мають ряд структурних недоліків, пов'язаних з технологією виготовлення (дефекти, пори, забруднення і т.п.), котрі призводять до флуктуацій діелектричної проникності та визначають характер поглинання та розсіяння світла [38, 39]. Крім того, структурні недоліки призводять до зміни параметрів плівки з часом чи внаслідок взаємодії з досліджуваним середовищем, коли можливе проникнення водних розчинів досліджуваної рідкої проби в пори по границям розділу кристалітів та в раковини, утворені при осадженні металу на підкладинку, що веде до зміни оптичних параметрів та, як наслідок, до відсутності стабільності та повторюваності робочих характеристик оптичного перетворювача.

Важливим фактором, котрий впливає на стабільність роботи ППР-сенсора, є адгезія збуджуючого поверхневий плазмон металу до підкладинки. Відомо, що благородні метали мають погану адгезію до діелектричних підкладок [40], тому в тонкоплівковій технології зазвичай використовують проміжні адгезійні шари таких металів як вольфрам, молібден чи хром для її покращення. В якості проміжного шару для збільшення адгезії з підкладкою найбільше розповсюдження отримав хром [41], у зв'язку зі стійкістю до механічного впливу [42], високою хімічною [43] та термічною [44] стабільністю.

На сьогодні вже проведений досить докладний розгляд широкого кола металів з погляду ППР, також була проаналізована ситуація, коли метали були б застосовані в комбінації, наприклад, золото-срібло, срібло-мідь та ін. Аналіз формул Френеля, що описують кутову залежність відбиття від багатошарової системи [45], показав: поляризаційні заряди верхньої поверхні структури визначаються знаком і величиною стрибка ϵ , між зовнішнім шаром і напівнескінченим середовищем. Тому чутливість частоти поверхневого

плазмону ω_p до зміни зовнішніх умов (ПЗ середовища, адсорбція молекулярного шару, зміна параметрів зовнішніх полімерних плівок) буде визначатися саме величиною ε зовнішнього металевого шару [46]. У той же час напівширина ППР-мінімуму визначається електропровідністю тонкого шару металу, що може знаходитися в глибині структури. В роботі [47] проаналізовано біметалічні структури Au/Ag, Au/Al, Al /Cu, Cu/Ag та розглянуто роль матеріалів у формуванні мінімуму ППР, коли один (верхній) формує чутливість до зміни зовнішнього середовища, а другий (нижній) забезпечує вузькість характеристики відбиття. В роботі [48] оптимізовано структуру біметалічного шару срібло-золото з точки зору досягнення максимальної чутливості та хімічної інертності оптичного перетворювача.

Важливу роль відіграє технологія виготовлення металевого шару ЧЕ. Основним фактором, котрий впливає на структуру та властивості металевих шарів, виготовлених методом термічного випаровування в вакуумі, є швидкість осадження і температура підкладки [43, 49]. Для металевого шару ЧЕ з золота при швидкості осадження 4-5 нм/с формується плівка максимальної щільності з відтворюваними оптичними параметрами та гомогенною гладкою поверхнею, в той час як для малих швидкостей осадження характерною є дрібнодисперсна, шорстка та рихла структура осаджених шарів, а для великих швидкостей осадження – крупнозерниста структура поверхні [50]. Для зменшення впливу рельєфу підкладки на шорсткість поверхні осаджених металевих шарів, поверхню підкладки готують за традиційною оптичною технологією, котра використовується при виготовленні оптичних деталей [51].

Зазвичай конденсація металів виконується без підігріву підкладки. Підвищення температури підкладки, впливаючи на умови акомодатії, десорбції та міграції атомів, призводить до збільшення зерен кристалітів і до зменшення кількості дефектів кристалічної ґратки з накопичуванням структурних дефектів на межах зерен [43]. При температурах підкладки

від 150 до 300 °С переважна кількість металевих плівок мають максимальну щільність [48].

Альтернативним шляхом впливу на структуру та властивості металевих плівок ЧЕ є температурний відпал [24]. Для термовакуумних плівок, котрі кристалізуються в умовах значного переохолодження при кімнатній температурі, температурний відпал є стабілізуючим фактором [25]. При термічній обробці зменшується концентрація дефектів кристалічної ґратки, структура плівок переходить в термодинамічно більш стійкий стан, котрому відповідають більш стабільні оптичні властивості [52]. Для полікристалічних плівок золота та срібла найбільш суттєва зміна структури зі збільшенням зерен проходить протягом перших 5-10 хвилин відпалу при відносно невисоких температурах (до 300°C) [53]. Для забезпечення мінімальної шорсткості рекомендується виконувати відпал при температурі 120 °С [54].

Основним й найрозповсюдженішим технологічним прийомом збільшення чутливості ППР-приладів до зміни ПЗ аналіту є збільшення площі поверхні ЧЕ. Найбільш поширеним способом збільшення площі поверхні є використання додаткового поруватого діелектричного шару [55].

В роботі [56] було запропоновано сенсор хвилеводного типу на основі плівки золота, покритої пористим оксидом алюмінію ($\text{por-Al}_2\text{O}_3$), отриманого анодизацією. У наступних роботах були використані нанопористі шари TiO_2 , полімерні плівки з циліндричними макродоменами та ін. У 2008 році в [57] теоретично та експериментально було встановлено, що введення адсорбату в сформований анодизацією $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ на шарі алюмінію на порядок збільшує чутливість ППР-сенсора. Було показано, що збільшення відгуку пов'язано зі збільшенням площі поверхні сенсорного елементу. Проте автори [57] встановили, що при анодизаційному способі формування $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ порушується адгезія традиційних плівок золота, що не дозволило їх використовувати для сенсорних потреб внаслідок відшарування металевого шару від підкладки підчас виконання вимірювань. Серед різних способів

формування матриць оксиду алюмінію були використані лазерні технології, в тому числі і метод імпульсного лазерного осадження (ІЛО). Метод успішно використовувався авторами [58, 59] при формуванні квантових точок кремнію і германію шляхом створення нанокмпозитних структур, що включають Si (Ge) нанокристали в SiO_2 , GeO_2 , Al_2O_3 матрицях. В роботах [60, 61] показано, що плівки $\text{por-Al}_2\text{O}_3$, виготовлені імпульсним лазерним осадженням, можуть бути використані для побудови чутливих елементів оптичних сенсорів вологості: при послідовному заміщенні у вимірювальній комірці кімнатного повітря на осушене, зміщення кутового положення мінімуму поверхневого плазмонного резонансу становило 0,4 кутових градусів ($\sim 4 \cdot 10^{-3}$ RIU), в той час як при заміщенні газового середовища на чистій плівці золота ніяких зміщень мінімуму не спостерігали. В цих роботах авторами зазначено, що одержана структура є гетерогенною і змінює свої адсорбуючі, оптичні властивості та геометричний профіль, що пов'язано з особливістю методу ІЛО. Такий стан речей робить практично неможливим досягнення повторюваності та стабільності результатів вимірювання показника заломлення за допомогою такої структури, тобто її можна використовувати лише для якісного аналізу. Авторами не проведено досліджень сенсорної чутливості створеної структури до різноманітних газових сумішей та рідких середовищ.

В роботах [62, 63] досліджено характеристики ППР для поруватих плівок золота, виготовлених методом (ІЛО), але не досліджено їх сенсорні властивості.

В роботі [64] досліджено оптичні та плазмонні властивості багатошарових структур Au-SiO_2 та $\text{Au-Al}_2\text{O}_3$, але не проведено досліджень сенсорних властивостей цих структур.

В роботі [65] запропоновано підвищувати площу поверхні не металевому шару, а тонкого шару полімеру, котрий наноситься безпосередньо на нього. Автори використовували біополімер $\text{poly-L-lactic-acid}$ (PLLA),

шорсткість поверхні котрого змінювали імпульсним лазерним опроміненням. Варіація шорсткості від 0,3 нм до 25 нм досягалася шляхом зміни потужності та тривалості імпульсів лазерного опромінення. Було досліджено спектри поглинання та виявлено наявність локалізованого ППР, сенсорні властивості такої плівки не досліджувалися.

В роботі [66] збільшували чутливість сенсору шляхом використання у якості адгезійного шару між металевим шаром та призмою ПВВ оксиду цинку (ZnO). Оксид цинку добували з цинку шляхом опроміненням високочастотним електромагнітним полем (13,56 МГц, 200 Вт) з підігрівом 200°C. Шари золота та хрому наносили електронно-променевим випаровуванням. Автори заявляють про збільшення чутливості в 1,45 рази (з $9,78 \cdot 10^{-6}$ до $6,76 \cdot 10^{-6}$ RIU). Авторами не проведено досліджень, що стосуються якості адгезії, стабільності створеної структури в неінертних середовищах та повторюваності результатів вимірювання, що ставить під сумнів можливість використання її в практичних цілях.

В роботі [67] використовували наночастинки срібла, закріплені на золотій поверхні ЧЕ за допомогою самоорганізуючого шару (self assembled monolayer (SAM)) 1-додекантіолу. Автори заявляють про збільшення чутливості в 1,6 рази ($\sim 6 \cdot 10^{-6}$ RIU) при аналізі рідких середовищ та в 9,4 ($\sim 1 \cdot 10^{-6}$ RIU) при аналізі газоподібних середовищ.

В роботах [68, 69] автори використовували оптоволоконний метод збудження ППР. Для підвищення чутливості автори застосували оптоволоконно зі змінною геометрією (в зоні металевого шару оптоволоконно звужувалося, що збільшувало щільність електромагнітної енергії) та додатковий діелектричний шар. В роботі [68] металевий шар представляв собою шар алюмінію (8 нм), а діелектричний шар – оксид титану TiO_2 (60 нм) для діапазону збуджуючих поверхневий плазмон довжин хвиль 750-850 нм. Чутливість такого сенсору становила для рідких середовищ 4000нм/RIU ($\sim 2,5 \cdot 10^{-7}$ RIU при кроці сканування довжини хвилі 0,001 нм). В роботі [69]

металевий шар представляв собою шар алюмінію (8 нм), а діелектричний шар – нітрид індію InN (30 нм). Чутливість такого сенсору становила для рідких середовищ 10800нм/RIU ($\sim 1 \cdot 10^{-8}$ RIU при кроці сканування довжини хвилі 0,001 нм).

Таким чином межа детектування сучасних ППР-приладів знаходиться в діапазоні від $\sim 1 \cdot 10^{-8}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ RIU, що дозволяє визначати концентрації в розчині аналіту від 10мг/мл до 0,1мг/мл, відповідно.

4.3. Особливості розвитку чутливих елементів біосенсорів

Ключовим фактором для успішної роботи ППР-сенсора є закріплення однієї з пари взаємодіючих молекул (рецептора) на чутливій поверхні ЧЕ. Процедура закріплення (іммобілізації) рецепторів повинна задовольняти вимогам збереження його нативного (тобто природного, незруйнованого) стану, відтворюваності і стабільності, а також не викликати хімічних або фізичних змін ЧЕ, які можуть призводити до небажаних оптичних ефектів (наприклад, розсіяння світла) [70]. Крім того, величина відгуку ЧЕ істотно залежать від орієнтації рецептора, що визначає доступність активних центрів (сайтів) рецептора і максимальну щільність заповнення ним поверхні ЧЕ [71].

Для іммобілізації рецептора на поверхню ЧЕ використовують два методи: прямий та непрямий. Прямий метод іммобілізації має ряд недоліків: низька адсорбція рецептора до поверхні, низька активність рецептору внаслідок неправильної орієнтації сайтів та нерівномірне осадження рецептора на поверхню ЧЕ. Непрямі методи використовують проміжний шар – лінкер, котрий орієнтує рецептор таким чином, щоб його сайти були розташовані до аналіту, що збільшує адсорбцію на поверхні ЧЕ. Процедуру нанесення лінкеру називають функціоналізацією поверхні. Для функціоналізації переважно використовують моношари алкантіолів та декстринові матриці [72-74].

Коло матеріалів для функціоналізації поверхні ЧЕ обмежене, тому актуальною задачею є використання нових матеріалів та методів функціоналізації, котрі забезпечать тривалий термін служби, високу швидкість функціоналізації поверхні ЧЕ і низьку вартість реагентів [75].

Адсорбція молекул аналіту на поверхні ЧЕ, не пов'язана зі специфічною взаємодією з рецепторним шаром, даватиме помилкові результати. Тому ще одним шляхом підвищення чутливості ЧЕ є запобігання шумового сигналу, викликаного неспецифічною адсорбцією [76, 77]. Просте експериментальне вирішення цієї проблеми полягає у використанні білків невеликого розміру (бичачий сироватковий альбумін (BSA), молекулярна маса 63 000 Да або етаноламін (EA), молекулярна маса 12 кДа) для заповнення незайнятих рецепторів.

В перших роботах, присвячених біоспецифічній взаємодії, дослідження виконували безпосередньо на поверхні золота ЧЕ [78]. Недоліком такої методики досліджень є нерегульована іммобілізація, що призводить до розташування рецепторів на поверхні сенсору неупорядковано і веде до їх денатурації та збільшення неспецифічної взаємодії аналіту з поверхнею ЧЕ, що зменшує чутливість ППР-приладу та збільшує абсолютну похибку вимірювання. Тому виникла необхідність у розробці спеціальних інтерфейсних матеріалів для функціоналізації поверхні ЧЕ, метою якої є регульована іммобілізація та зменшення неспецифічного зв'язування рецепторного шару з аналітом. Загальновизнаною для таких застосувань є функціоналізація поверхні ЧЕ організованими органічними моношарами, які наносять на металеву поверхню ЧЕ або методом мимовільної хемосорбції з розчину, або перенесенням плівок, сформованих на межі розділу рідина-газ за методом Ленгмюра-Блоджет [79]. Такі щільно упаковані та стабільні плівки можна використовувати в однокомпонентному вигляді [80] і у вигляді змішаних моношарових матриць, що містять, наприклад, функціональні групи, котрі сприяють або перешкоджають адсорбції білків [81].

Імобілізація рецепторів на таких біосумісних поверхнях здійснюється за допомогою фізичної адсорбції, недоліками якої є неоднорідне і неорієнтоване заповнення поверхні не більше, ніж на 40%, а також істотна неспецифічна адсорбція [82]. Більш досконалою технікою імобілізації рецепторів можна вважати розробку двошарових структур, в яких самоорганізований моношар діє як хімічно зв'язуючий прошарок для калексаренів, декстранів або біслойних ліпідних мембран з вбудованими рецепторами [73, 83].

Фірми-виробники ППР-приладів (наприклад, Pharmacia і Affinity Sensors) використовують методику імобілізації рецепторів за допомогою ковалентного зв'язку всередині тривимірної структури полісахаридного гідрогелю - декстрану (товщина функціоналізованого шару 100 - 200 нм) [74, 84]. В цьому випадку процес закріплення рецепторів заснований на дії сил електростатичного притягання між позитивно зарядженими молекулами білка і попередньо активованою матрицею гідрогелю [85]. Для видалення рецепторів з матриці і регенерації поверхні для її повторного використання розроблена також методика дезактивації [86]. До недоліків використання декстранів слід віднести складну методику нанесення, високу вартість вихідної речовини та зменшення чутливості ППР-сенсору за рахунок великої товщини імобілізованого шару разом з шаром гідрогелю.

Враховуючі недоліки існуючих методів функціоналізації поверхні чутливих елементів ППР-приладів існує проблема створення перспективних альтернативних методів, котрі забезпечать як високу адсорбцію на поверхні чутливого елементу рецептора так і його нативність, а також суттєво знизять вартість підготовки вимірювання та вихідних реактивів. Вирішенню цих проблем присвячені наступні розділи книги.

РОЗДІЛ 5

АНАЛІЗ ЧИННИКІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ТОЧНІСТЬ ВИМІРЮВАННЯ ТА ЧУТЛИВІСТЬ ПРИЛАДІВ

5.1. Довжина хвилі, топологія чутливого елементу та температура досліджуваного середовища та елементів оптичної схеми приладу

Довжина хвилі збудження поверхневих плазмонів

Зміна довжини хвилі збуджуючого випромінювання викликає зміну ПЗ як аналіту, так і елементів оптичної схеми вимірювального пристрою разом з ЧЕ. Внаслідок цього змінюється форма характеристики відбиття (Рис. 5.1).

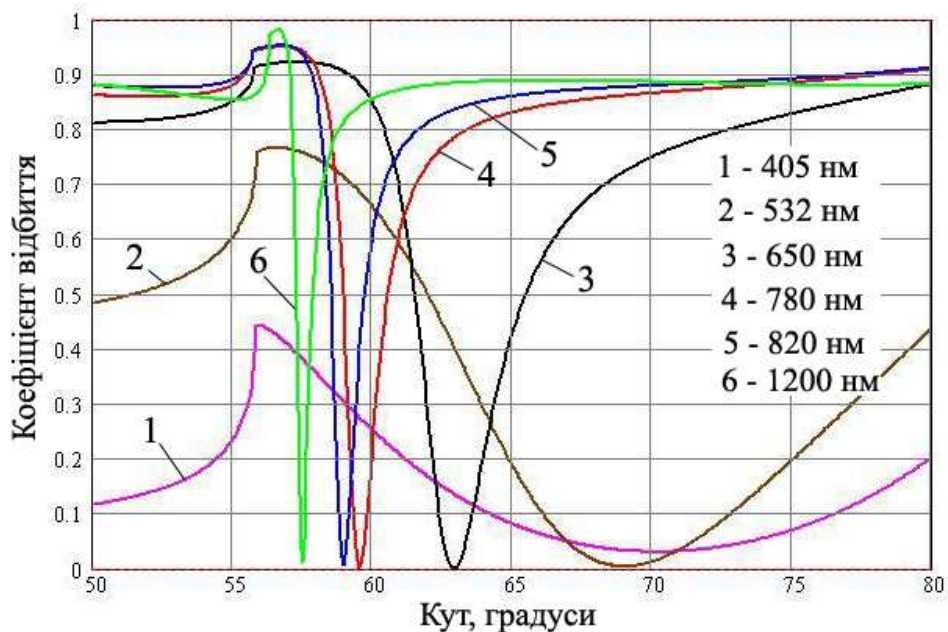


Рис. 5.1. Результати чисельного аналізу розрахункової залежності $R(\theta)$ для різних довжин хвиль оптичного діапазону для збудження ППР.

Зміна форми характеристики відбиття призводить до збільшення абсолютної похибки вимірювання кутового положення її мінімуму при апроксимації та, як наслідок, до зростання абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналіту. Абсолютна похибка вимірювання ПЗ аналіту при зміні довжини хвилі збудження залежить від форми характеристики відбиття та є наслідком апроксимації результатів вимірювання, котра необхідна для компенсації великого кроку кутового сканування ППР-приладу. Для чисельного розрахунку величини абсолютної похибки було виконано побудову

характеристик відбиття $R(\theta)$ для діапазону довжин хвиль від 589 до 1200 нм. Значення оптичних констант для моделювання взяті з джерел [1, 2]. Товщина металевого шару $d_M = 50$ нм, ПЗ аналіту $n_A = 1,0003$. Межі діапазону довжин хвиль були обрані за результатами попередніх розрахунків, котрі визначили, що:

1. При довжинах хвиль, менших за 589 нм, мінімум характеристики відбиття $R(\theta)$ втрачає екстремум, а форма кривої стає суттєво несиметричною;

2. При довжинах хвиль, більших за 1200 нм, зменшується кількість вимірних значень при кутовому скануванні та коефіцієнт відбиття в мінімумі характеристики відбиття $R(\theta)$ стає більшим 0,2, що зменшує динамічний кутовий діапазон вимірювання в режимі Slope.

Абсолютна похибка апроксимації має дві складові: методичну похибку та похибку, викликану, власне, зміною ширини характеристики відбиття $R(\theta)$. Методична похибка залежить від симетричності характеристики відбиття $R(\theta)$, кутового діапазону апроксимації та пов'язаного з ним амплітудного діапазону апроксимації. Зменшення методичної похибки апроксимації під час моделювання можливе при виконанні наступних двох умов: 1) апроксимація проводиться тільки обмеженої нижньої частини характеристики відбиття $R(\theta)$ в районі мінімуму (Рис. 5.2,б); 2) характеристика відбиття $R(\theta)$ має форму, близьку до симетричної в районі свого мінімуму [3]. Рекомендовано виконувати апроксимацію ділянки в районі мінімуму на рівні нижче 25% від максимуму характеристики відбиття $R(\theta)$. У випадку, коли розглядається характеристика відбиття $R(\theta)$ з вираженою асиметрією, кращі результати дає таке ж несиметричне розташування позицій початку та кінця оброблюваної ділянки кривої. В роботі [4] досліджувався вплив ступеню полінома на похибку визначення мінімуму за допомогою апроксимації при довжині хвилі 650 нм. Авторами роботи зазначається, що найбільш простим і надійним для апроксимації є

поліном 2-го порядку, але при несиметричності кривої ППР задовільні результати можна встановити лише при значному обмеженні (до 5%) висоти ділянки апроксимації. В діапазоні довжин хвиль, обраному для моделювання, характеристика відбиття $R(\theta)$ суттєво змінює свою ширину, тому кутовий діапазон апроксимації було обрано кратним ширині характеристики відбиття $R(\theta)$ по амплітудному рівню 20% (Рис. 5.2, а). Додатково було застосовано несиметричне розташування позицій початку та кінця оброблюваної ділянки кривої. Таким чином, були створені умови для зменшення методичної похибки внаслідок незначного розкиду амплітудного діапазону апроксимації в межах 10-23%.

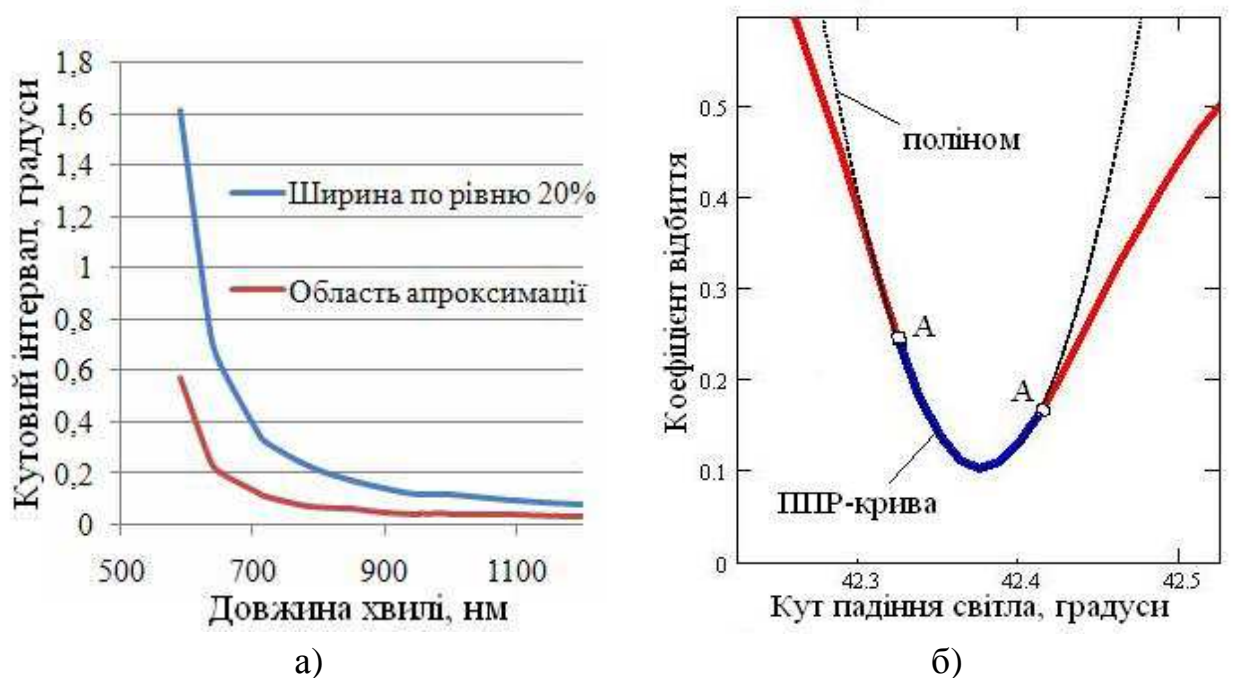


Рис. 5.2. Результати чисельного аналізу ширини в околі мінімуму (по рівню 20%) характеристики відбиття $R(\theta)$ та кутового діапазону апроксимації від довжини хвилі (а); апроксимація мінімуму (б) розрахункової $R(\theta)$ при несиметричному розташуванні позицій початку і кінця оброблюваної ділянки (відрізок А-А).

Величину абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналізу визначали з різниці між кутовим положенням двох характеристик відбиття $R(\theta)$ для кожної довжини хвилі: перша характеристика відбиття була побудована з кроком 0,025, і кутове положення її мінімуму визначалось шляхом

апроксимації, а друга була побудована з кроком 0,0001, і кутове положення її мінімуму відповідало мінімальному значенню коефіцієнта відбиття. В результаті чисельного розрахунку залежності абсолютної похибки апроксимації від довжини хвилі було встановлено, що найбільше значення абсолютної похибки у діапазоні $(19...21) \cdot 10^{-5}$ RIU має місце при довжині хвилі 650 нм за умови апроксимації поліномами 3-го та 4-го ступеню та при довжині 635 нм за умови апроксимації поліномом 2-го ступеню (Рис. 5.3.).

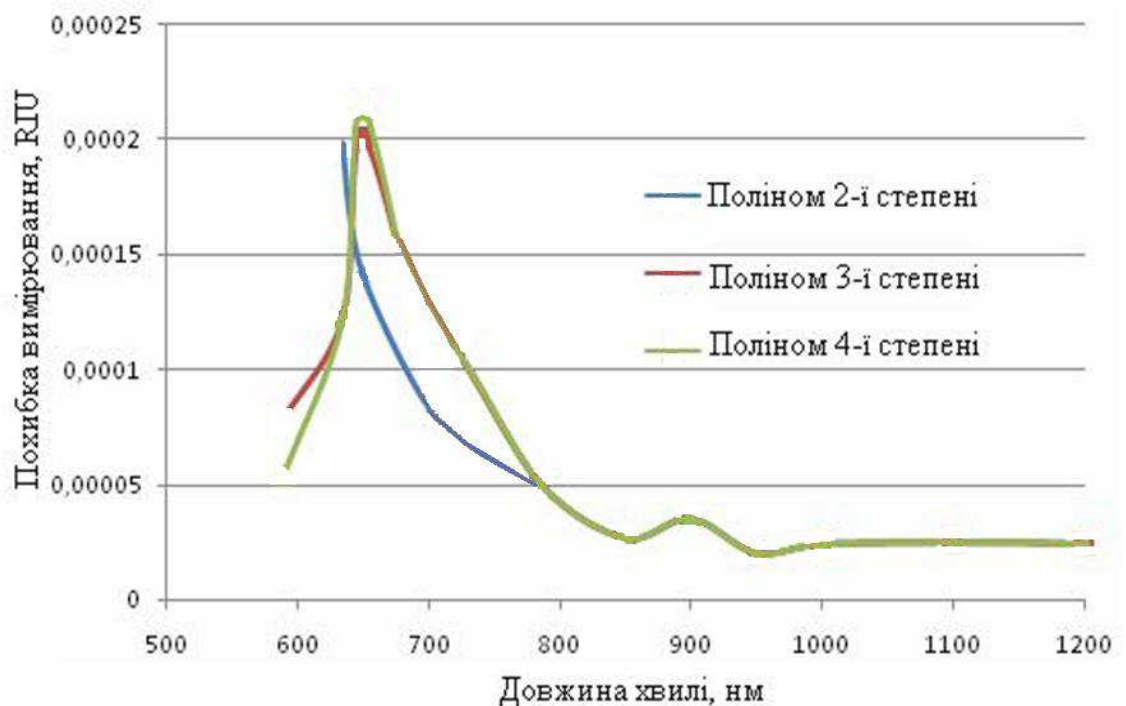


Рис. 5.3. Результати чисельного аналізу абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналізу для діапазону довжин хвиль від 590 нм до 1200 нм.

При збільшенні довжини хвилі абсолютна похибка спадає за експонентою ($\delta n(\lambda) = 0,121 \cdot e^{-0,01\lambda}$), і в діапазоні довжин хвиль 850...1200 нм знаходиться в межах $(2...3,5) \cdot 10^{-5}$ RIU, що пояснюється більшою симетричністю і вузькістю характеристики відбиття $R(\theta)$ в околі мінімуму (на рівні 20 %).

Збільшення довжини хвилі впливає на чутливість ППР-приладу внаслідок звуження характеристики відбиття та збільшення крутизни її схилів, що викликає підвищення чутливості S_S (Рис. 5.4, а). В режимі Multiple

спостерігається зниження чутливості S_θ (Рис. 5.4, б.). Тому зміна чутливості S_R в режимі вимірювання Slope не є пропорційною крутизні схилів характеристики відбиття, а зменшується зі зростанням довжини хвилі через те, що рух робочої точки залежить від величини зсуву її мінімуму.

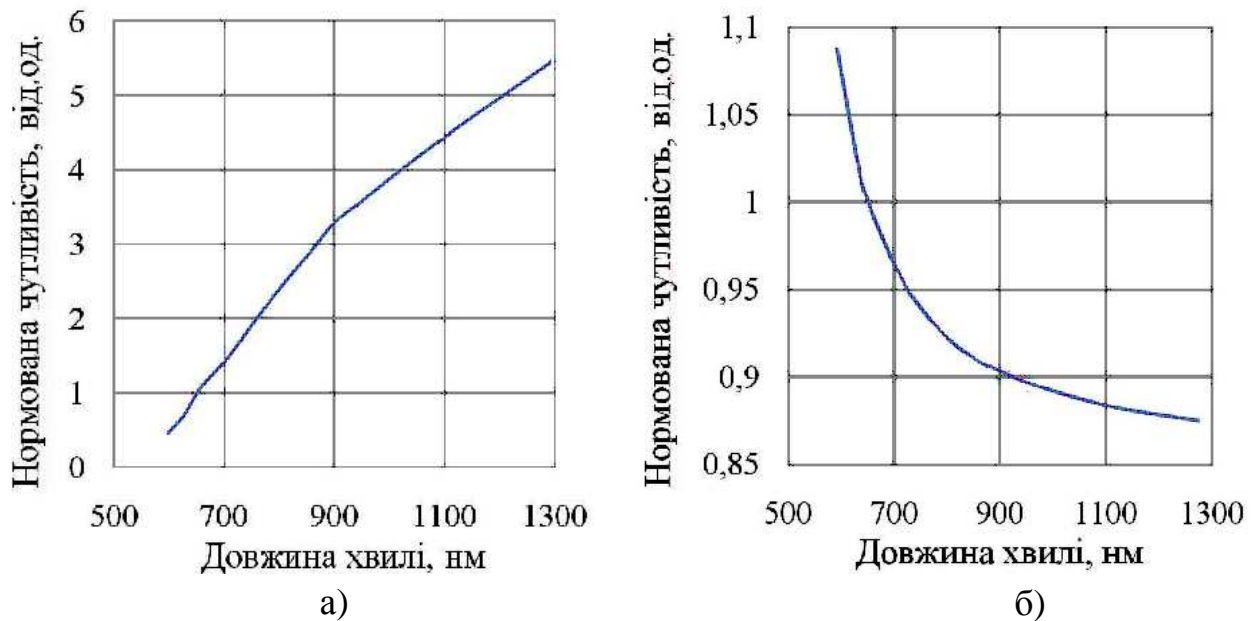


Рис. 5.4. Результати чисельного аналізу залежності нормованої чутливості від довжини хвилі збудження S_S (а) та в режимі Multiple (б).

Збільшення довжини хвилі від 650 до 1200 нм підвищує чутливість приладу в 5 разів: з 5,13 В/град до 26 В/град та зменшує абсолютну похибку вимірювання ПЗ аналіту в 5,5 разів: від $\pm 6,2 \cdot 10^{-5}$ до $\pm 1,1 \cdot 10^{-5}$, тому подальшим етапом експериментальних дослідження необхідно оптимізувати довжини хвилі лазерного діода з врахуванням наявних напівпровідникових лазерів, котрі серійно виробляються.

Топологія поверхні чутливого елемента

Для визначення впливу топології поверхні на абсолютну похибку вимірювання ПЗ аналіту було використано модель з проміжним шаром, який описує мікросорсткість поверхні ЧЕ. Цей проміжний шар складається як з речовини аналіту, так і з речовини матеріалу металевого шару ЧЕ і описується оптичними параметрами n_e , k_e , d_e . Через те, що сорсткість

описується середньою висотою y_{cp} нерівностей поверхні відносно базової лінії l і в спрощеному вигляді може бути представлена сумою висот вершин y_i відносно базової лінії відносно їх кількості m [5], було запропоновано моделювати мікрошорсткість поверхні металевого шару ЧЕ у вигляді 1-D моделі, котра представляє собою вершини конусної форми з висотою h_k та d_k . Для визначення оптичних параметрів проміжного шару n_e , k_e була застосована модель ефективного середовища Максвелла-Гарнетта [2], а товщина шару визначалась висотою вершини як $d_e = d_k$ (5.1):

$$\frac{\varepsilon_e - \varepsilon_M}{\varepsilon_e + 2\varepsilon_M} = q_A \frac{\varepsilon_A - \varepsilon_M}{\varepsilon_A + 2\varepsilon_M}, \quad (5.1)$$

де ε_e – ефективна діелектрична проникність проміжного шару;

ε_M – діелектрична проникність металу ППР-сенсора;

ε_A – діелектрична проникність аналіту;

q_A – відносна об’ємна частка аналіту, $q_A = 0,61$.

Відносна об’ємна частка аналіту в проміжному шарі визначалась як відношення різниці елементарного об’єму проміжного шару V_{e0} та конуса V_k до елементарного об’єму проміжного шару (5.2):

$$q_A = \frac{V_{e0} - V_k}{V_{e0}} = \frac{h_k \cdot d_k^2 - 0.125 \cdot h_k \cdot \pi \cdot d_k^2}{h_k \cdot d_k^2} \quad (5.2)$$

Діелектрична проникність металевого шару ЧЕ визначалась комплексно як $\varepsilon_M = \varepsilon_{MR} + i \cdot \varepsilon_{MI}$, де ε_{MR} та ε_{MI} , відповідно, дійсна та уявна складові діелектричної проникності ε_M . Складові діелектричної проникності металу пов’язані з його показником заломлення [2] через співвідношення (5.3):

$$\varepsilon_{MR} = n_M^2 + k_M^2 \quad (5.3,a)$$

$$\varepsilon_{MI} = 2 \cdot n_M \cdot k_M \quad (5.3,b)$$

Розраховані значення оптичних параметрів проміжного шару наступні $n_e = 0,15647$, $k_e = 2,26058$. Параметри багат шарової системи для моделювання наведені в таблиці 5.1. Параметром, що змінювався, була

товщина проміжного шару h_e . Товщина проміжного шару варіювалася в діапазоні від 1 до 20 нм з кроком 1 нм.

Таблиця 5.1
Параметри багатошарової системи ЧЕ

№ шару	Назва шару	Позначення констант	Товщина, нм	ПЗ	Коефіцієнт екстинції
1	Призма	n_p	-	1,5145	0
2	Металевий	n_M, k_M, d_M	50	0,18309	3,24413
3	Проміжний	n_e, k_e, d_e	20...0	0,15647	2,26058
4	Аналіт	n_A	-	1,0003	0

Результат чисельного моделювання зміни кутового положення мінімуму характеристики відбиття $R(\theta)$ та її ширини на рівні 20% від максимуму коефіцієнта відбиття при зміні товщини проміжного шару ЧЕ представлено на графіках (рис. 5.5).

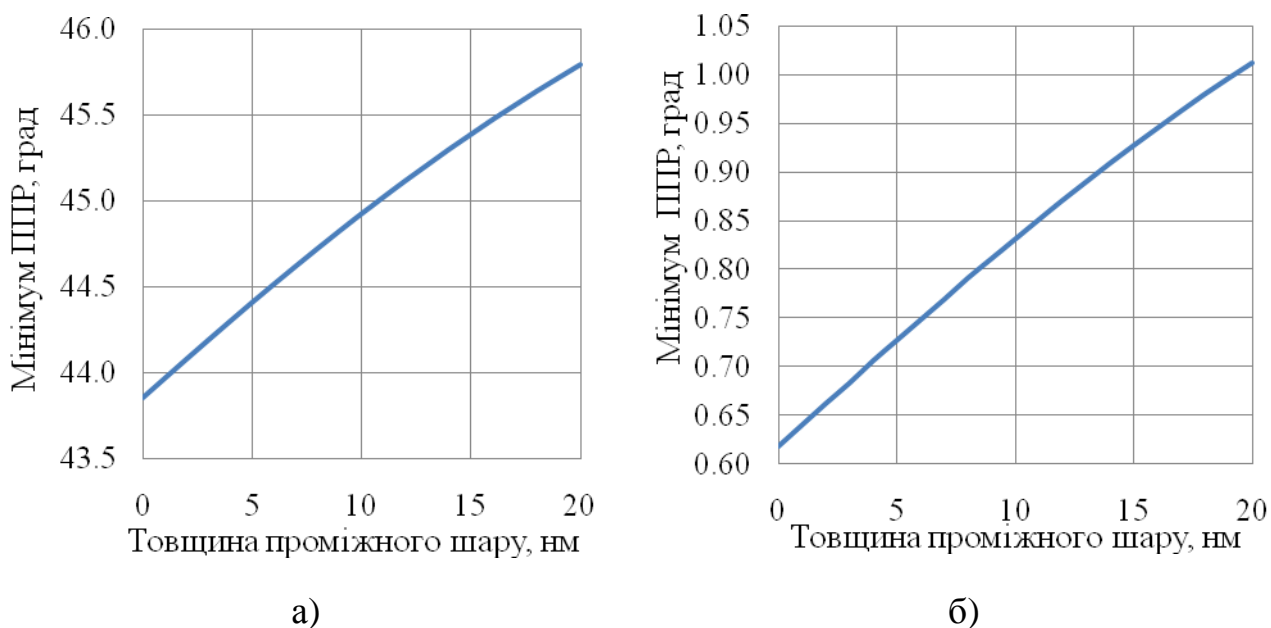


Рис. 5.5. Результати чисельного аналізу залежності кутового положення (а) та ширини (б) мінімуму характеристики відбиття $R(\theta)$ від товщини проміжного шару ЧЕ.

З графіків видно, що збільшення товщини проміжного шару, котра визначається мікрошорсткістю поверхні ЧЕ або додаткового поруватого шару, призводить до зсуву положення мінімуму та розширення кривої ППР. До того ж, при нанесенні додаткового поруватого шару крім зміни

ефективного показника заломлення збільшується площа ефективної взаємодії його з аналітом.

Для визначення абсолютної похибки результату вимірювання, викликаной неоднорідністю поверхні металевому шару ЧЕ, було введено зміну ПЗ аналіту для двох значень $dn_{A1} = 1 \cdot 10^{-3}$ і $dn_{A2} = 1 \cdot 10^{-2}$ у параметри моделі та розраховано зсув мінімуму характеристики відбиття $R(\theta)$ $\Delta\theta_{\min}$ для цих значень при різній товщині проміжного шару. Абсолютна похибка визначалась як різниця між величиною зсуву при відсутності проміжного шару (ідеальний випадок) та величиною зсуву при наявності проміжного шару та була виражена у відносних одиницях (рис. 5.6).

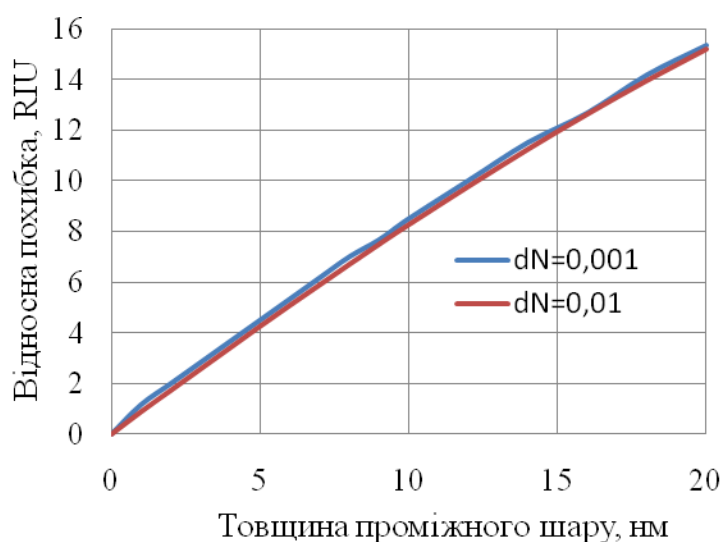


Рис. 5.6. Результати чисельного аналізу відносної похибки вимірювання ПЗ аналіту від товщини проміжного шару ЧЕ.

Результати чисельного аналізу показали, що для зміни ПЗ аналіту dn_a від 0,001 RIU до 0,01 RIU абсолютна похибка змінюється відповідно в межах від $4 \cdot 10^{-5}$ RIU до $15 \cdot 10^{-5}$ RIU при зміні величині мікрошорсткості металевій поверхні чутливого елементу від 5 до 20 нм.

Залежність чутливості ППР-приладу від неоднорідності поверхні металевому шару ЧЕ викликана як збільшенням товщини проміжного шару, так і зміною форми характеристики відбиття $R(\theta)$. Через те що прилад «Плазмон-6» має два режими роботи Multiple та Slope, то відповідно

матимемо дві залежності чутливості від товщини проміжного шару. Розширення характеристики відбиття $R(\theta)$ (рис. 5.5,б) веде до зменшення крутизни нахилу лівого схилу кривої, що зменшує чутливість в режимі Slope (рис. 5.7,а). Проміжний шар товщиною 20 нм зменшує чутливість майже вдвічі. Натомість в режимі Multiple збільшення проміжного шару підвищує чутливість (рис. 5.7,б) за рахунок збільшення добутку $n_e d_e$, котрий відповідає за величину зсуву мінімуму характеристики відбиття $R(\theta)$.

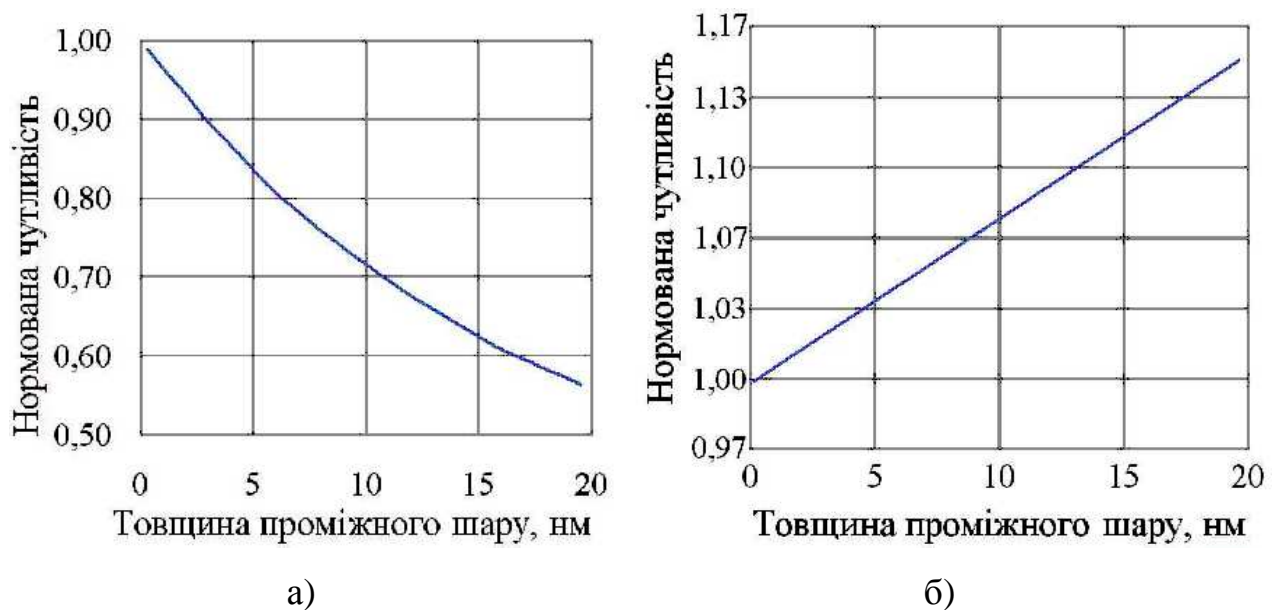


Рис. 5.7. Результати чисельного аналізу залежності чутливості ППР-приладу в режимах Slope (а) та Multiple (б) від товщини проміжного шару.

За результатами чисельного аналізу встановлено, що збільшення неоднорідності поверхні металевого шару ЧЕ збільшує абсолютну похибку вимірювання ПЗ аналіту та чутливість ППР-приладу в режимі вимірювання Multiple за рахунок збільшення товщини проміжного шару між металевим шаром ЧЕ та аналітом. При цьому чутливість в режимі Slope зменшується з 5,13 В/град до 2,82 В/град при зростанні мікروشорсткості поверхні ЧЕ від 0 до 20 нм, що пояснюється зменшенням крутизни лівого схилу характеристики відбиття $R(\theta)$ внаслідок її розширення. Причому чутливість приладу спадає на 2,2% на кожний додатковий нанометр висоти мікروشорсткості.

Для підвищення точності вимірювання ПЗ аналіту та чутливості приладу в режимі вимірювання Slope треба зменшувати мікрошорсткість поверхні металевому шару ЧЕ. Досягнення цієї мети можливо за рахунок розробки нових технологій нанесення на підкладинку металевому шару ЧЕ. Запропонована технологія повинна бути обґрунтована фізичними методами аналізу стану поверхні, зокрема атомно-силовою мікроскопією.

Додатковий діелектричний шар на поверхні чутливого елемента

Основним з напрямків підвищення чутливості приладів є формування додаткового діелектричного шару на поверхні металевому шару ЧЕ у вигляді оксидів металів та полімерних матриць. Підвищення чутливості досягається застосуванням додаткових пористих шарів оксидів металів, нанесених на поверхню металевому шару, за рахунок збільшення ефективної поверхні взаємодії електромагнітного поля поверхневого плазмону з аналітом та збільшення концентрації газоподібного аналіту на поверхні ЧЕ за рахунок абсорбції молекул аналіту в пори оксидного шару. Причому, чим більша товщина пористого діелектричного шару, тим більше абсорбується молекул аналіту і, як результат, підвищується чутливість ППР-приладу загалом. Недоліком такого способу модернізації чутливого елемента є:

1. Зсув ППР-кривої у бік більших кутів падіння, що зменшує діапазон вимірювання приладу;
2. Зменшення інтенсивності поля плазмону над поверхнею структури, що зменшує рівень відгуку ЧЕ.

Для аналізу впливу додаткового діелектричного шару на поверхні металевому шару ЧЕ було проведено чисельне моделювання залежності чутливості сенсору ППР від товщини додаткового діелектричного шару (Рис. 5.8). Моделювання було виконано для діелектричного шару зі значенням ПЗ $n = 1,5$ та діапазоном товщин від 0 до 250 нм. Діапазон товщин зовнішнього діелектричного шару обмежений технологією нанесення

вакуумними методами однорідної структури на поверхню ЧЕ та глибиною проникнення поля поверхневого плазмону у створену структуру. Глибина проникнення електричного поля залежить від довжини хвилі збудження поверхневих плазмонів [6]. Для довжини хвилі 650 нм глибина проникнення поля становить 240 нм. Існує певне оптимальне значення товщини діелектричного шару (~50 нм), якому відповідає зростання рівня відгуку ППР приблизно на 20% (рис. 5.8).

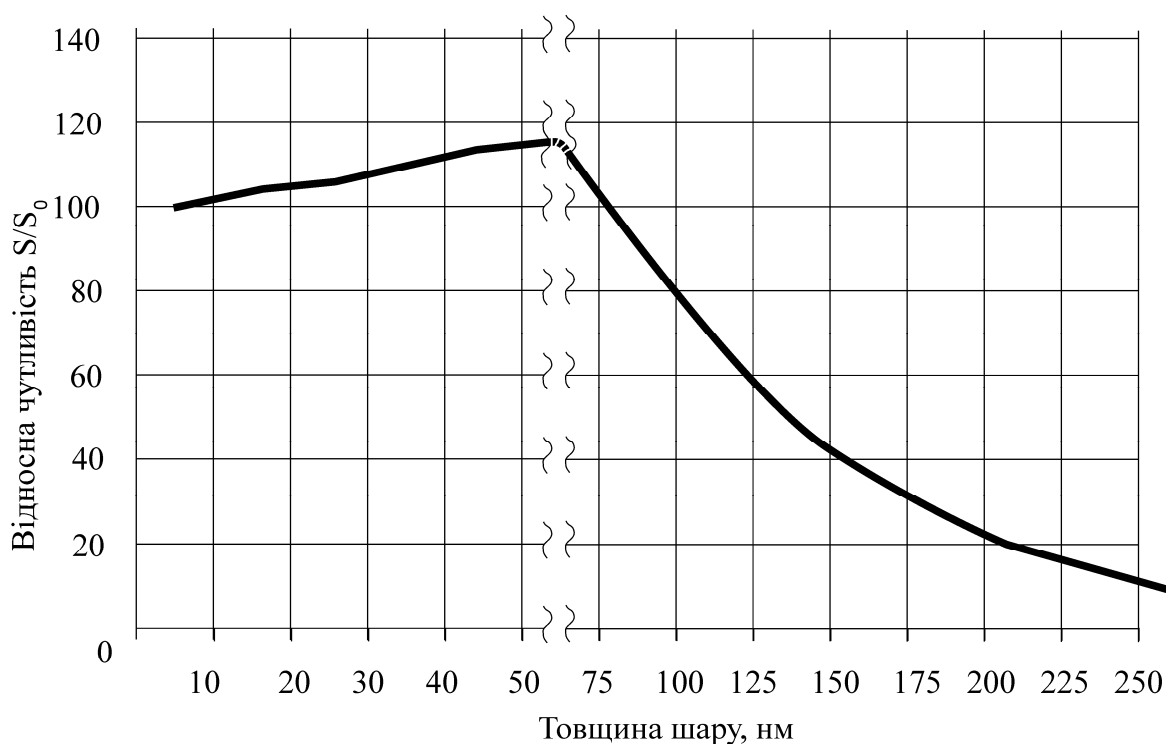


Рис. 5.8. Результати чисельного моделювання відносної чутливості від товщини додаткового діелектричного шару.

Додатково було проведено чисельне моделювання багатошарової структури ЧЕ ППР-сенсора при наявності додаткового діелектричного шару пористого оксиду кремнію. Задачею даного аналізу було визначення діапазону допустимих товщин додаткового діелектричного шару з врахуванням меж діапазону вимірювання приладу «Плазмон-6». Розрахунки було проведено для двох аналітів: газового середовища (повітря) (Рис. 5.9,а) та рідинного середовища (дистильована вода) (Рис. 5.9,б). Вихідними даними

для розрахунку були оптичні константи напівпентапризм приладу Ф1-65 та К8-50, повітря та дистильованої води і плазмон збуджуючого шару золота ЧЕ.

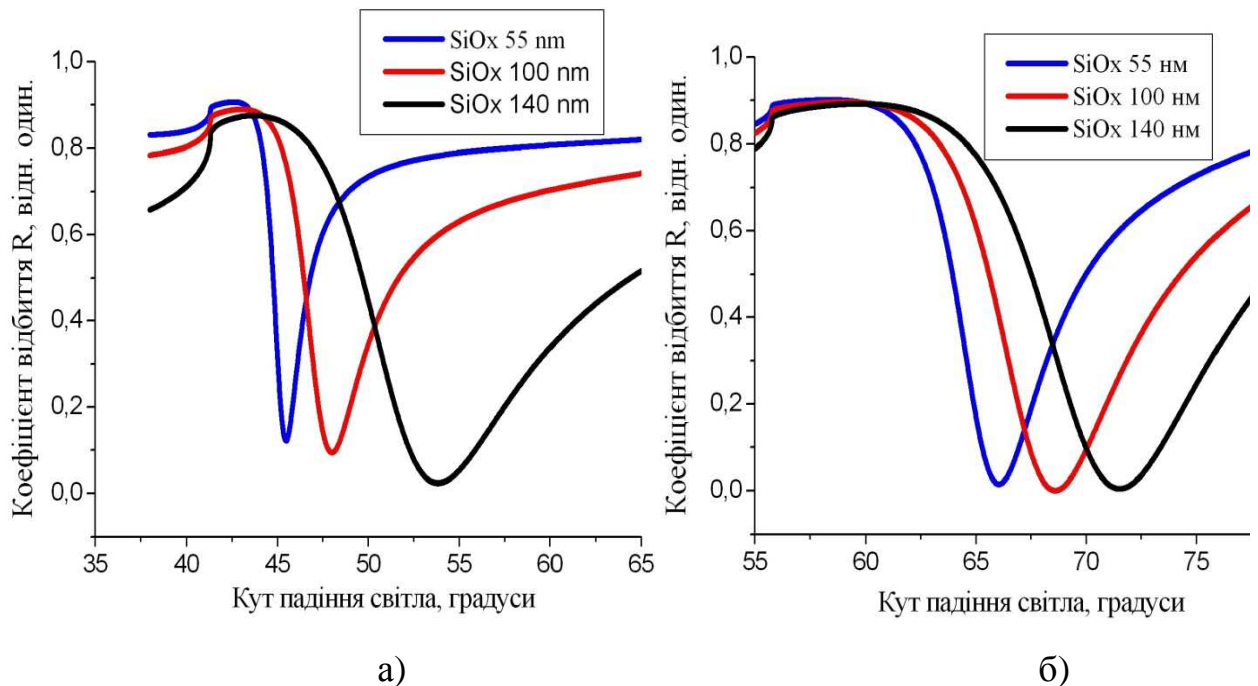


Рис. 5.9. Результати чисельного моделювання залежності $R(\theta)$ при зміні товщини додаткового діелектричного шару SiO_x при дослідженні повітря (а) та дистильованої води (б).

Оптичні константи додаткового діелектричного шару поруватого оксиду кремнію становили $n_v = 1,4756$, $k_v = 0$. Чисельний аналіз було проведено для трьох товщин діелектричного шару: 55 нм, 100 нм та 140 нм.

На основі чисельного аналізу було встановлено, що додатковий діелектричний шар на поверхні ЧЕ збільшує чутливість ППР-сенсору за рахунок хвелеводного ефекту. Крім того у якості діелектричного шару може бути використаний поруватий шар оксиду кремнію для збільшення чутливості ППР-приладу за рахунок розвиненої поверхні. Чисельний аналіз характеристик відбиття показав, що максимальна товщина шару обмежена діапазоном вимірювання кутів падіння приладу та становить 140 нм та 100 нм для повітря та води, відповідно.

Зміна температури досліджуваного середовища та елементів оптичної схеми приладу

Вплив температури на чутливість ППР-приладів виражається абсолютною похибкою результату вимірювання δN_T , що викликана температурною зміною ПЗ елементів оптичної схеми приладу та аналіту під час проведення процесу вимірювання. Величина цієї абсолютної похибки залежить від зміни температури під час вимірювання і значень температурних коефіцієнтів ПЗ елементів оптичної схеми приладу та аналіту.

Основними елементами оптичної схеми ППР-приладу, зміна ПЗ яких суттєво впливає на величину абсолютної похибки результату вимірювання ПЗ аналіта, є напівпентапризма та металевий шар ЧЕ. Крім того, на результат вимірювання ПЗ аналіту впливає температурна зміна довжини хвилі лазера. Температурний коефіцієнт довжини хвилі лазера становить (0,12...0,15) нм/К [7]. Температурна зміна ПЗ n та коефіцієнта екстинції k металевої шару ЧЕ насамперед пов'язані зі зменшенням щільності носіїв заряду (електронів) в ньому, що викликано як об'ємним тепловим розширенням металевої плівки, так і тепловими коливаннями кристалічної ґратки металу. Щільність електронів в металевій плівці (5.4) обернено пропорційна зміні температури та коефіцієнту об'ємного теплового розширення [8]. Щільність електронів визначає плазмову частоту (5.5), котра, згідно з моделлю Друде, разом з частотою електромагнітної хвилі випромінювання лазера та частотою зіткнень визначають величину комплексної діелектричної проникності металу (5.6).

$$D(T) = D_0(T_0)[1 + 3 \cdot \gamma_v (T - T_0)]^{-1} \quad (5.4)$$

Де, D – щільність електронів при температурі T ;

D_0 – щільність електронів при температурі T_0 ;

γ_v – коефіцієнт об'ємного розширення металу $\gamma_v = \gamma(1 + \mu)/(1 - \mu)$, K^{-1} ;

γ – коефіцієнт лінійного розширення металу, K^{-1} ;

μ – коефіцієнт Пуассона.

$$\omega_p(T) = \sqrt{\frac{4\pi D(T)e^2}{m^*}} \quad (5.5)$$

Де, ω_p – частота плазмону в металі, с^{-1} ;

e – заряд електрону, Кл;

m^* - ефективна маса електрону, кг.

$$\varepsilon_M(T) = 1 - \frac{\omega_p^2(T)}{\omega(T) \cdot (\omega(T) + j\omega_c(T))} \quad (5.6)$$

Де, ε_M – комплексна діелектрична проникність металу;

ω – частота електромагнітної хвилі випромінювання лазеру, с^{-1} ;

ω_c – частота зіткнень електронів та фононів, с^{-1} .

За формулою (5.3) визначаються параметри \mathbf{n} та \mathbf{k} , котрі також залежать від температури. Температурна залежність товщини металевієї плівки визначається формулою (5.7):

$$d_M = d_{M0}[1 + \gamma_v (T - T_0)] \quad (5.7)$$

За даними [8] температурні коефіцієнти показника заломлення \mathbf{n} та коефіцієнта екстинції \mathbf{k} для золота при довжині хвилі 650 нм становлять, відповідно: $\text{TKn} = 3,4 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ та $\text{TKk} = -1,4 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$. Впливом різниці між температурним лінійним розширенням металевого шару ЧЕ та скляної підкладки можна знехтувати, оскільки метал має більше значення температурного коефіцієнту лінійного розширення $\gamma_M = 14,2 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, ніж матеріал підкладки (скло марки Ф-1) $\gamma_P = 7,8 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$, тому внутрішні напруження викликані силами стискання не руйнуватимуть металевий шар ЧЕ.

Температурна зміна ПЗ напівпентапризми визначається величиною температурного коефіцієнта матеріалу з якого вона виготовлена. Для приладів серії «Плазмон» напівпентапризми виготовляються зі стекол марок К8 ($\mathbf{n}_P = 1,5145$) та Ф1 ($\mathbf{n}_P = 1,6154$), для вимірювання газоподібних та рідких аналітів відповідно. Температурні коефіцієнти показника заломлення стекол цих марок наступні: $1,2 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ для марки К8 та $3 \cdot 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ для марки Ф1[9].

Для дистильованої води ($n_A = 1,3314$), як рідкого аналіту, температурний коефіцієнт ПЗ становить $-1 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$, а температурний коефіцієнт ПЗ осушеного повітря ($n_A = 1,00028$) становить $-2,5 \cdot 10^{-5} \text{ K}^{-1}$ [10]. За величинами температурних коефіцієнтів елементів оптичної схеми ППР-приладу можна зробити висновок, що найбільший вплив на зміну результату вимірювання ППР-приладу буде чинити саме температурна зміна ПЗ аналіту.

Для аналізу величини впливу зміни температури конструктивних елементів оптичної схеми та аналіту на точність вимірювань було проведено чисельне моделювання температурного зсуву мінімуму залежності $R(\theta)$ (Рис. 5.10).

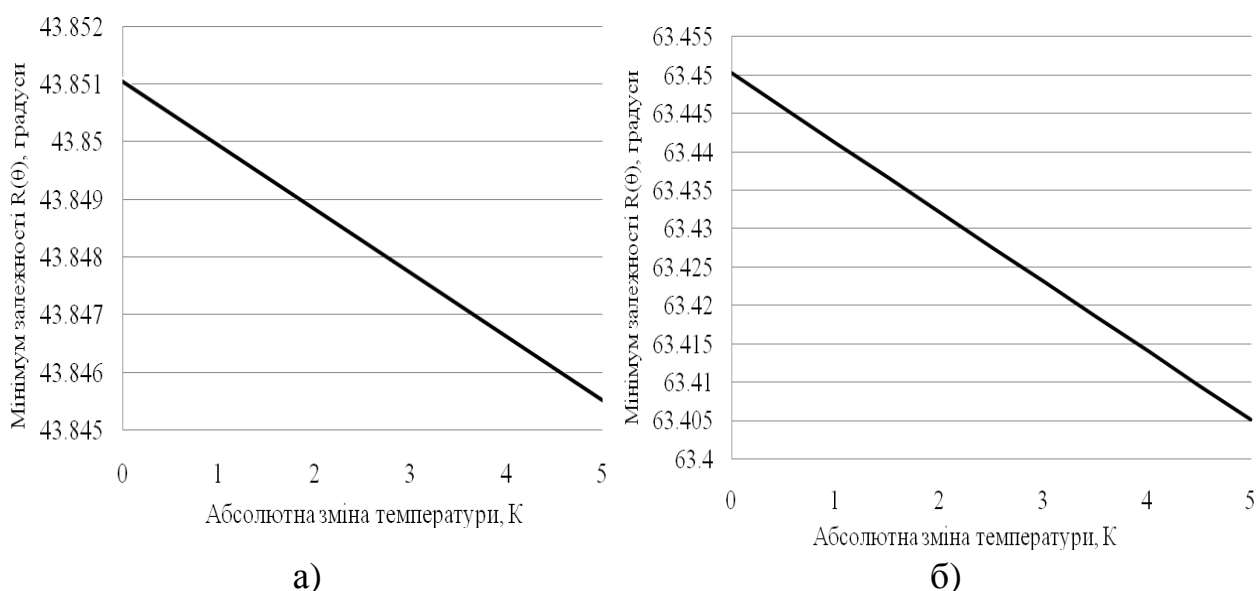


Рис. 5.10. Результати чисельного моделювання впливу зміни температури на кутове положення мінімуму залежності $R(\theta)$ для аналітів повітря (а) та дистильованої води (б).

Було враховано температурні залежності показників заломлення аналіту n_A (повітря та дистильованої води), призми ПВВ n_p , довжини хвилі лазера та параметрів золоті півки n_M , k_M та d_M . Діапазон зміни температури становив 5 K, а саме: від 293 K до 298 K.

Таким чином, чисельними методами показано вплив зміни температури аналіту та елементів оптичної схеми ППР-приладу на величину

температурної похибки δN_T та встановлено величини температурного дрейфу мінімуму характеристики відбиття $R(\theta)$, а саме:

- $\delta N_T = 6,72 \cdot 10^{-5}$ RIU при зміні температури на 5 К для аналізу повітря;
- $\delta N_T = 54,24 \cdot 10^{-5}$ RIU при зміні температури на 5 К для аналізу вода;
- 4,03 кут.сек./К температурний дрейф для аналізу повітря;
- 32,54 кут.сек./К температурний дрейф для аналізу води.

Через те, що теоретично було обрано діапазон зміни температури 5 К, необхідно експериментально визначити основні джерела тепловиділення елементів конструкції приладу серії «Плазмон» та діапазон зміни температури аналізу, напівпентапризми, напівпровідникового лазеру та ЧЕ.

Для експериментального визначення температури аналізу, напівпентапризми, напівпровідникового лазеру та ЧЕ, а також основних джерел тепловиділення елементів конструкції приладу серії «Плазмон» необхідно вибрати метод вимірювання температури.

Існують дві групи методів вимірювання температури: контактні та безконтактні. До контактних методів вимірювання температури належать термоелектричні та терморезистивні методи. Основними перевагами контактних методів є широкий діапазон вимірювання, надійність, низька вартість та можливість працювати в різних середовищах. До недоліків слід віднести контакт засобу вимірювання з об'єктом вимірювання, що викликає взаємний теплообмін і підвищує похибку та складність вимірювання температури реальних об'ємних конструкційних елементів. До безконтактних методів вимірювання належать пірометричні, тепловізійні та електромагнітні методи. Перевагами цих методів вимірювання, у порівнянні з контактними методами, є відсутність теплового контакту засобу вимірювання з об'єктом вимірювання і можливість вимірювання температури на значних площах поверхонь елементів конструкції зі складною конфігурацією геометрії поверхні. Крім того сучасні тепловізори

дозволяють вимірювати температуру з високою чутливістю та роздільною здатністю, кращою ніж 0,1 К.

Тому, для визначення основних джерел тепловиділення елементів конструкції ППР-приладу необхідно застосувати тепловізійний метод вимірювання температури та розробити відповідний алгоритм визначення основних джерел тепловиділення елементів конструкції приладу.

5.2. Конструкторсько-технологічні шляхи підвищення точності вимірювання та чутливості приладів

Вдосконалення технології отримання чутливого елементу

За результатами експериментів в попередніх розділах та чисельного моделювання було встановлено, що для зменшення абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналізу та підвищення чутливості необхідно зменшити неоднорідність поверхні металевому шару ЧЕ. Тому була поставлена задача вдосконалити технологію виготовлення ЧЕ для забезпечення меншої неоднорідності поверхні металевому шару. Було висунуто гіпотезу, що осадження металічного шару під кутом рівним куту збудження ППР має збільшити чутливість сенсору. Для підтвердження її справедливості було запропоновано та реалізовано вдосконалення існуючої технології осадження у вакуумі металевих плівок на діелектричну підкладку, а саме:

- 1) Виконували осадження у два етапи: осадження базового шару та осадження робочого шару;
- 2) Базовий шар осаджували під кутом 0° між напрямом на випаровувач та нормаллю до поверхні підкладки, тобто за існуючою технологією;
- 3) Робочий шар осаджували на базовий шар під кутом 45° та 70° між напрямом на випаровувач та нормаллю до поверхні підкладки ЧЕ.

Для дослідження впливу технології ЧЕ на сенсорну чутливість та точність вимірювання було виготовлено три зразки:

- 1) Виготовлений вакуумним осадженням за існуючою технологією з товщиною металевому шару рівним 50 ± 2 нм;
- 2) Виготовлений за вдосконаленою технологією з товщиною базового і робочого шару по 30 нм, причому робочий шар був осаджений під кутом 45° між напрямом на випаровувач та нормаллю до поверхні підкладки ЧЕ;
- 3) Виготовлений за вдосконаленою технологією з товщиною базового і робочого шару по 30 нм, причому робочий шар був осаджений під кутом 70° між напрямом на випаровувач та нормаллю до поверхні підкладки ЧЕ.

Дослідження топології металеві поверхні чутливого елемента виготовленого за вдосконаленою технологією було виконано атомно-силовою мікроскопією (Рис. 5.11.).

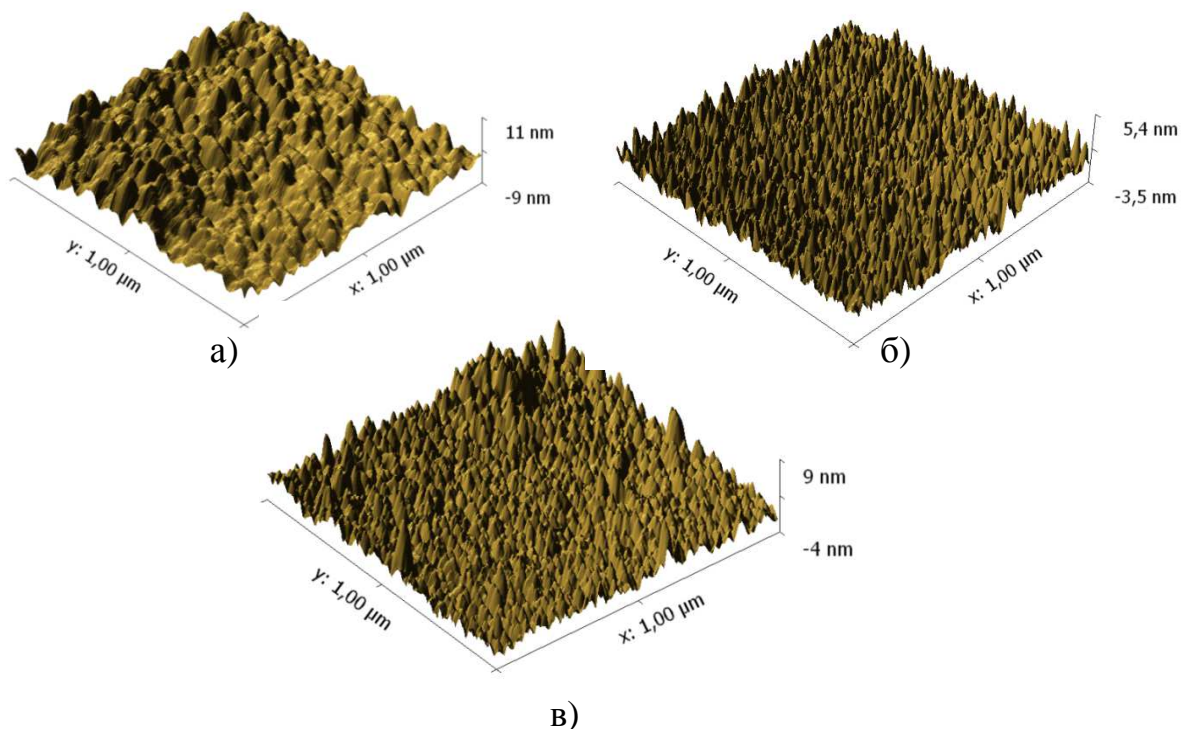


Рис. 5.11. Топологія поверхні металевому шару ЧЕ отримана атомно-силовою мікроскопією для технологій осадження: існуюча (а) та вдосконалена для кута осадження 45° (б) та 70° (в).

Кут осадження робочого шару було обрано з наступних умов: значення кута має бути більшим за 30° , щоб отримати максимальний ефект від зміни

положення підкладки відносно випаровувача і зменшення складності виготовлення оснастки. Адгезійний шар хрому складав 5 нм [11].

За результатами аналізу топології поверхні було встановлено, що виготовлення ЧЕ за вдосконаленою технологією формування металевого шару при куті осадження рівному 45° зменшило середню неоднорідність поверхні (з 2 нм до 0,8 нм) у порівнянні з ЧЕ, виготовленим за існуючою технологією. Для зразка ЧЕ виготовленого за вдосконаленою технологією при куті осадження 70° , середня неоднорідність поверхні була зменшена з 2 нм до 1,2 нм, але поверхня була неоднорідна з стовпчатою структурою.

Визначення сенсорної чутливості вдосконалих ЧЕ було проведено на вдосконаленому приладі серії «Плазмон» з довжиною хвилі 850 нм. Спочатку було виміряно характеристики відбиття для відповідних ЧЕ та встановлено, що для ЧЕ, виготовленого за вдосконаленою технологією осадження металевого шару під кутом 45° , характеристика відбиття є більш вузькою, а її мінімум зсунутий у бік менших кутів падіння (Рис. 5.12, крива 1) у порівнянні з ЧЕ, виготовленим за існуючою технологією (Рис. 5.12, крива 2).

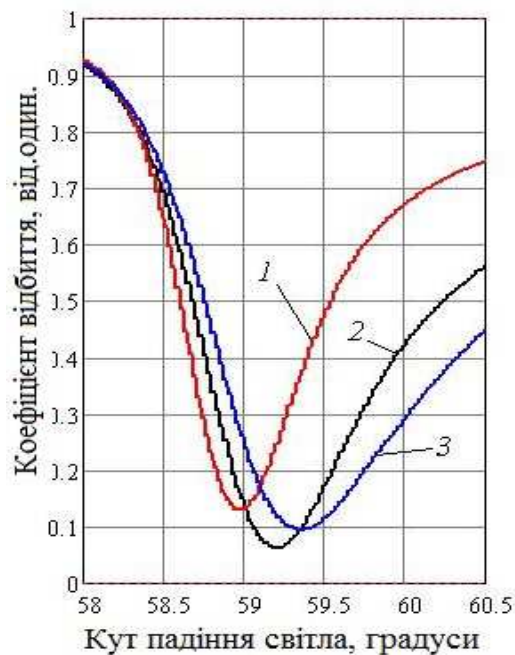


Рис. 5.12. Експериментальні залежності характеристики відбиття $R(\theta)$ для чутливого елемента виробленого за технологіями осадження: існуючою (2) та вдосконаленою для кута осадження 45° (1) та 70° (3).

Експериментально було встановлено, що при розташуванні поверхні підкладки ЧЕ під кутом 45° між нормаллю до підкладки та напрямом на випаровувач, відгук ЧЕ збільшився в 1,5 рази при аналізі рідких середовищ та в 2 рази при аналізі газоподібних середовищ. Як приклад, наведені концентраційні залежності для розчинів KCl та газових сумішей парів етанолу для вдосконаленої технології (Рис. 5.13). Концентраційні залежності апроксимуються лінійними функціями зсуву кута мінімуму ППР $\Delta\theta_{sp}$ від концентрації аналіту C для розчину хлориду калію та повітряної суміші парів етанолу, відповідно: $\Delta\theta_{sp} = 1,308 \cdot C - 2,161$ та $\Delta\theta_{sp} = 0,925 \cdot C + 0,326$.

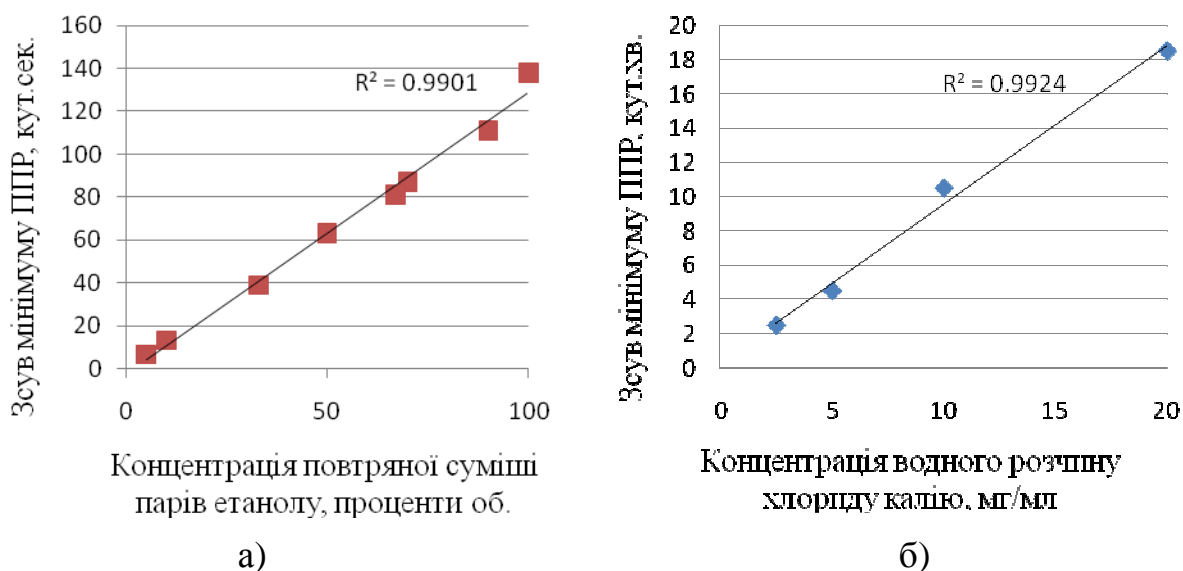


Рис. 5.13. Експериментальні концентраційні залежності для водних розчинів KCl (а) та газових сумішей парів етанолу (б) для запропонованої технології нанесення шару золота.

Крім того, було визначено абсолютну похибку вимірювання ПЗ за рахунок зменшення неоднорідності поверхні та товщини проміжного шару в 2,5 рази: з 2 нм до 0,8 нм. За рахунок звуження кривої ППР було зменшено абсолютну похибку вимірювання ПЗ аналіту, викликану процедурою апроксимації, в 5 разів: від $\pm 0,7 \cdot 10^{-5}$ до $\pm 0,12 \cdot 10^{-5}$. Звуження кривої підвищило крутизну нахилу її схилів в 1,5 рази: від $3,4 \text{ град}^{-1}$ до $5,1 \text{ град}^{-1}$, що і було причиною підвищення чутливості приладу в 1,5 рази в режимі вимірювання Slope: від 12,5 В/град до 17,6 В/град. Одержані результати

підтверджені авторами роботи [12]. Запровадження нової технології формування плівки металу ЧЕ не тільки зменшило абсолютну похибку результату вимірювання ПЗ аналіту, а також додатково підвищило чутливість за рахунок збільшення крутизни схилів кривої ППР та упорядкованості структури поверхні ЧЕ і збільшення локального ефективного показника заломлення на межі поділу чутливий елемент-аналіт [13, 14].

Вдосконалення конструкції чутливого елементу

Оскільки дослідження сенсорної чутливості додаткового шару поруватого оксиду алюмінію обмежувались лише визначенням рівня відгуку такого ЧЕ на пари вологого повітря [15], була поставлена задача дослідити сенсорну чутливість ЧЕ з таким додатковим шаром до розчинників, котрі широко використовуються в приладобудуванні. Для дослідження було обрано наступні аналіти: ацетон, етанол, гексан та пари води для порівняння. Додатковий шар поруватого оксиду алюмінію виготовляли методом імпульсного лазерного осадження (ІЛО). Поруватість плівок забезпечувалась осадженням оксиду алюмінію від зворотнього низькоенергетичного потоку наночастинок ерозійного факелу на підкладинку з попередньо нанесеним шаром золота товщиною 50 ± 2 нм. Промінь YAG:Nd^{3+} лазеру, котрий працював в режимі модульованої добротності (довжина хвилі лазеру 1,06 мкм, енергія в імпульсі 0,2 Дж, тривалість імпульсу 8 нс, частота модуляції 25 Гц) сканував мішень у вакуумній камері в атмосфері аргону та кисню із тиском 6-15 Па. Щільність енергії опромінення мішені становила 5-20 Дж/см². Тривалість осадження поруватого шару складала близько 6 хвилин. Товщина плівок $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ на довжині 20 мм була в діапазоні значень 30 – 200 нм [15, 16]. Об'єктами дослідження були два типи зразків з товщинами плівок 55 ± 5 нм та 190 ± 10 нм. На сформованих структурах визначали вплив парів аналітів на кутову залежність відбиття світла $R(\theta)$. Для введення аналіту використовували виготовлену з полістиролу двохканальну вимірювальну

кювету об'ємом 30 мкл, з'єднану силіконовими трубками з мікронасосом. Очищували вимірювальну кювету осушеним кімнатним повітрям. Вимірювання кутових залежностей відбиття світла $R(\theta)$ від меж поділу $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ – металевий шар – скло виконували на приладі «Плазмон-6». На Рис. 5.14. наведено експериментальні криві кутової залежності $R(\theta)$ для двох плівок $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ різної товщини під час вимірювання осушеного кімнатного повітря (крива 1), насиченої пари води (крива 2), ацетона (крива 3), етанолу (крива 4) та гексана (крива 5). Чутливість досліджуваних структур до аналізу визначали за зміщенням положення мінімуму кутової залежності $R(\theta)$. Було визначено, що для більш тонкої плівки (55 нм) значення зсуву мінімуму ППР-кривої складає 0,6 градуси, а для більш товстої (190 нм) зсув складає до 1,7 градуси.

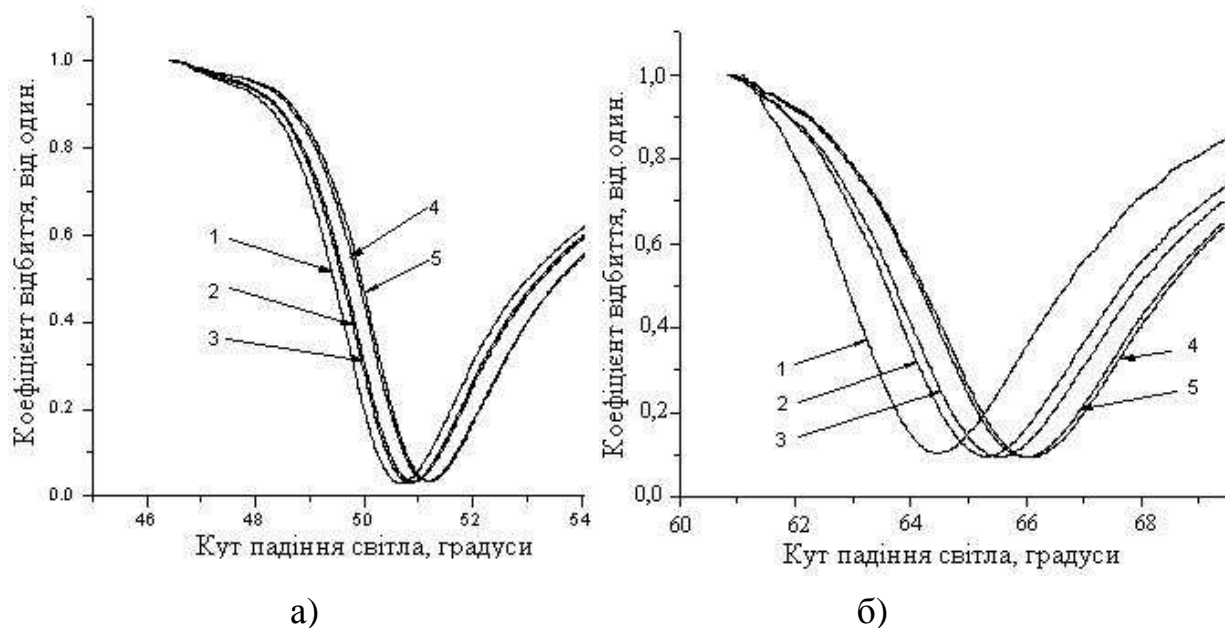


Рис. 5.14. Кутові залежності відбиття світла $R(\theta)$ для плівок $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ товщиною 55 нм (а) та 190 нм (б) з аналітами: осушене кімнатне повітря (крива 1), насичені пари води (крива 2), ацетон (крива 3), етанол (крива 4) та гексан (крива 5).

Було встановлено експериментально, що найбільший відгук структури спостерігався для насиченого пару етанолу та гексану ($1,71^\circ$ та $0,66^\circ$, відповідно) [17]. При цьому найменший відгук спостерігався при заміщенні

осушеного повітря на насичену пару етанолу (0,21°). У порівнянні з відгуком чистого золота на відповідні аналіти структура з товстою плівкою $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ давала збільшення відгуку від 30 до 34 разів (в залежності від типу аналіту), а тонка плівка $\text{por-Al}_2\text{O}_3$ - збільшення відгуку у межах від 5 до 12 разів. Різниця в збільшенні відгуку пов'язана як з більшою абсорбційною здатністю плівки, так і з розмірами молекул аналітів. Недолік цих структур: відсутність повторюваності результатів вимірювання за рахунок клиновидного профілю.

Авторами роботи [18] було проведено комплекс експериментів, який включав технологію нанесення, вивчення топології структури та впливу додаткового шару SiO_x на характеристики ППР. Зразки у вигляді тонких плівок SiO_x одержували термічним випаровуванням у вакуумі (при залишковому тиску $1\div 2 \times 10^{-3}$ Па) монооксиду кремнію чистотою 99.9% виробництва фірми Ceras Inc. Зразки знаходились в камері на відстані 25 см від випаровувача під кутами від 0° до 75° між нормаллю до поверхні підкладинки та напрямом на випаровувач. Швидкість осадження плівки на підкладинку, орієнтовану перпендикулярно потоку випаровуваної речовини, становила 5 нм/с, і швидкість випаровування не змінювалась зі збільшенням кута нахилу підкладинки (α). Товщина плівок контролювалася *in situ* методом кварцового осцилятора, а після напилення вимірювалася мікроінтерферометром МП-4.

З допомогою вакуумного термічного нанесення під кутом 75 градусів між напрямом на випаровувач та нормаллю до підкладинки було проведено осадження поруватих SiO_x плівок на стандартні діелектричні підкладинки з нанесеним шаром золота. Було виготовлено експериментальні зразки з різними товщинами адсорбуючого шару (в інтервалі 50 – 140 нм) та додаткового шару золота (10 – 30 нм). Неоднорідність товщин зразка не перевищувала 5%.

Структуру плівок SiO_x , осаджених під різними кутами, вивчали за допомогою високороздільного електронного мікроскопа ZEISS EVO 50XVP.

На Рис.5.15. показана мікрофотографія перерізу досліджуваної плівки SiO_x , осадженої під кутом 75° . Осаджені під кутом плівки мали колончатую структуру, причому колони нахилені по відношенню до нормалі до підкладки на певний кут (β), який залежить від кута осадження плівок (α). Структура плівок не змінювалась внаслідок високотемпературного відпалу у вакуумі чи в атмосфері інертного газу, що визначає їх стабільність. Подібна структура спостерігалась для плівок багатьох речовин, скісно осаджених у вакуумі, причому співвідношення між кутами (α) та (β) описується певними емпіричними залежностями. Зокрема, для малих α інколи справджується так зване правило тангенсів: $\tan\beta = 0,5\tan\alpha$. Для великих α це співвідношення краще описується правилом косинусів: $\beta = \alpha - \arcsin[(1 - \cos\alpha)/2]$.

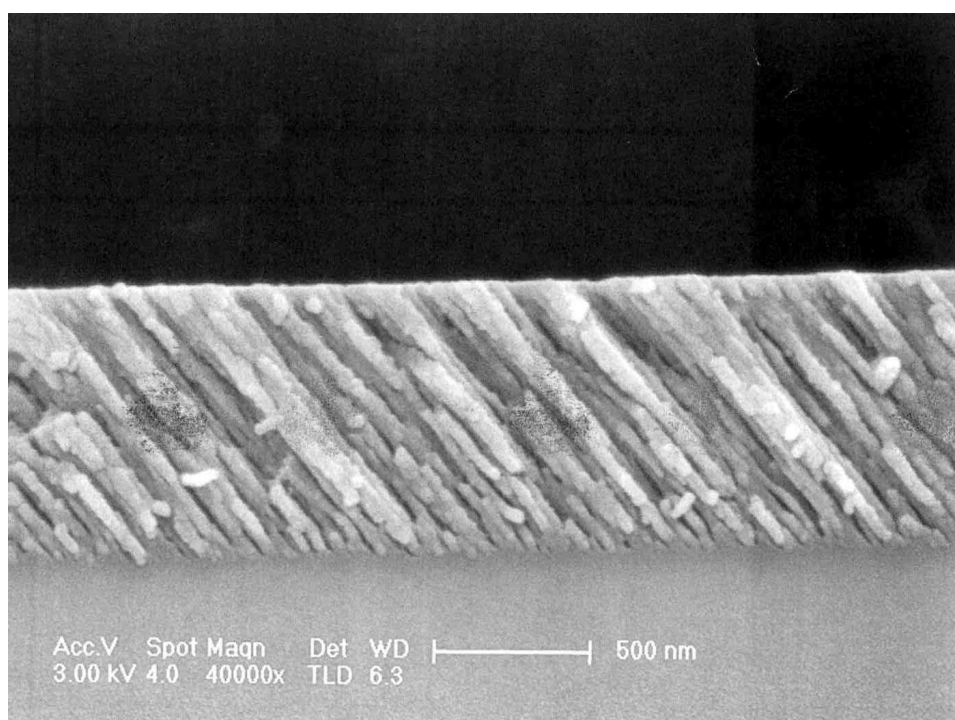


Рис. 5.15. Мікрофотографія структури поруватої плівки SiO_x , осадженої під кутом 75° .

В табл. 5.2 подано експериментальні дані значень кутів для досліджуваних зразків, а також значення, розраховані за правилами тангенсів β (tan) та косинусів β (cos).

Таблиця 5.2

Кути нахилів колончатої структури SiO_x

α	β (експеримент)	β (tan)	β (cos)
60°	26° - 29°	41°	45°
75°	36° - 41°	62°	53°

Для великих значень кута α (75° і вище) експериментальний результат краще описується правилом косинусів, але відхилення між цими значеннями залишається досить значним, що пояснюється впливом залишкових газів у вакуумній камері. В роботі [19] показано, що нахил колон в таких поруватих структурах суттєво залежить від тиску залишкового газу, особливо в інтервалі $1 - 10^{-2}$ Па, коли відбувається розсіяння потоку випарованої речовини на молекулах залишкового газу. Однак у випадку, що розглядається, тиск у вакуумній камері був достатньо низьким ($2 \cdot 10^{-3}$ Па) для балістичного прольоту випаровуваних часток від випаровувача до підкладинки, тому відхилення від емпіричних значень мало іншу природу. Було зроблено припущення, що нахил колон визначається, в основному, співвідношенням між ефектами затінення та рухливості осаджених фрагментів на підкладинці [20], тобто швидкістю осадження випаровуваних часток та утворення зародків кристалізації на підкладці.

Експериментально було встановлено, що густина досліджуваних плівок ρ значно зменшується при збільшенні кута їх осадження, що свідчить про зростання поруватості таких шарів. Так при куті осадження 0° їх густина становила $1,9 \text{ г/см}^3$, а при куті осадження 75° лише $0,91 \text{ г/см}^3$. Поруватість зразків з однаковою масою SiO_x , осадженого на одиницю площі підкладинки, визначалась як $(d(\alpha) - d(0))/d(\alpha)$, де $d(\alpha)$ - товщина плівки, осадженої під кутом α , $d(0)$ - товщина нормально напиленої плівки. Для досліджуваних зразків були розраховані величини поруватості 12%, 34% та 53% для кутів осадження 30° , 60° та 75° , відповідно. Ці величини були визначені відносно

плівки, напиленої при $\alpha = 0^\circ$. Однак, як було показано в роботі [21], навіть напилені по нормалі до підкладинки плівки мають поруватість в межах 8-10%, тому сумарний вміст пустот в досліджуваних плівках буде становити в середньому 20%, 40%, та 57%, відповідно.

Визначення складу плівок (значення x) базувалось на встановленій в роботі [22] монотонній залежності положення максимуму основної смуги поглинання в ІЧ спектрах шарів SiO_x в області $1000 - 1100 \text{ см}^{-1}$ (зумовленої поперечними валентними коливаннями місткового кисню – розтягуюча мода Si-O-Si), від складу плівки. Оскільки в ІЧ спектрах в даній області проявляються лише коливання кремній-кисневої фази, а зв'язки Si-Si не реєструються, то даний метод було використано для визначення складу оксидної матриці як в свіжонапилених, так і у відпалених зразках, які містили фазу кремнію. Зі збільшенням кута осадження збільшувався вміст кисню в складі плівки, тому максимум спектру поглинання зсувався з 1005 см^{-1} до 1048 см^{-1} , для кутів напилення 0° та 75° , відповідно. Оскільки всі зразки осаджувались в тотожних умовах (при однаковій швидкості напилення та тиску залишкових газів), зміна їх складу була пов'язана із формуванням поруватої структури. Доокислення плівок в процесі осадження суттєво було прискорене при збільшенні їх поруватості, яка визначалась кутом осадження випареної речовини. Тому, змінюючи кут осадження, можна змінювати як структуру, так і склад SiO_x шару. Тому для рефрактометричних досліджень і були обрані плівки, осаджені під кутом 75° , так як вони мали максимальну пористість та могли представляти інтерес для сенсорного застосування.

При дослідженні ППР кривих виготовлених поруватих плівок підкладинками для зразків були пластинки зі скла Ф1 ($n = 1,615$) розміром $20 \times 20 \times 1 \text{ мм}$ з шаром золота (Au^1) товщиною 35 нм. На половині кожного зразка знаходився термічно нанесений шар поруватого оксиду кремнію, а на другій половині поверх шару SiO_x був ще нанесений додатковий шар золота (Au^2) товщиною 20-30 нм. Усі зразки мали однакову товщину підшару хрому

(Cr) та золота (Au^1), відповідно 3 нм і 35 нм. Відрізнялись шари товщиною адсорбуючого шару SiO_x і верхнього шару золота (Au^2).

На приладі «Плазмон-6» вимірювали кутові залежності інтенсивності внутрішнього відбиття $R(\theta)$ для плівки золота і досліджуваних зразків. Оскільки прилад «Плазмон-6» є двоканальним, тому один канал вимірював інтенсивність відбиття $R(\theta)$ для структури скло-Cr- Au^1 - SiO_x - Au^2 , а другий канал для структури скло-Cr- Au^1 - SiO_x , причому вимірювання в обох каналах проводилися одночасно. Додатковий шар золота був використаний для зсуву мінімуму ППР у бік менших кутів. Параметри досліджуваних зразків наведено в таблиці 5.3.

Таблиця 5.3

Експериментальні результати вимірювання ЧЕ з шаром SiO_x

№ зразка	Товщина шарів зразка, нм			Мінімум КППР, град	
	Au1	SiOx	Au2	Зразок	Золото
2	35	140	30	68	63,3
				73	
3		115	30	63	63,2
				63	
5		55	20	66,4	62,8
				68	
6		55	20	66	62,9
				67,3	
8		105	30	65,7	63,4
				71	
10		105	30	66,5	63,5
				72	

Виміряні характеристики відбиття $R(\theta)$ на структурах скло-Cr- Au^1 - SiO_x зображені на Рис. 5.16. Як видно з рисунку, структурам з більшою товщиною оксидного шару SiO_x відповідають більші кути мінімуму ППР. Для зразків 1, 2, 8 та 10 мінімум не був виміряний, так як він знаходився за межами діапазону вимірювання ППР-приладу. На Рис. 5.17 зображені $R(\theta)$ виміряні на структурах скло-Cr- Au^1 - SiO_x - Au^2 . При цьому, нанесення

верхнього шару золота призвело до зсуву мінімумів у сторону менших кутів падіння, що зробило можливим їх визначити для зразків 1, 2, 8 та 10, які не були виміряні при відсутності додаткового шару золота.

Експериментально встановлено, що структурам з більшою товщиною оксидного шару SiO_x (зразки 1 та 2 мають товщину SiO_x , що дорівнює 140 нм) відповідають більші кути мінімуму характеристики відбиття. При зменшенні товщини адсорбуючого шару (зразки 8 та 10 – 105 нм, зразки 5 та 6 – 55 нм) спостерігається зсув кривих у сторону менших кутів падіння.

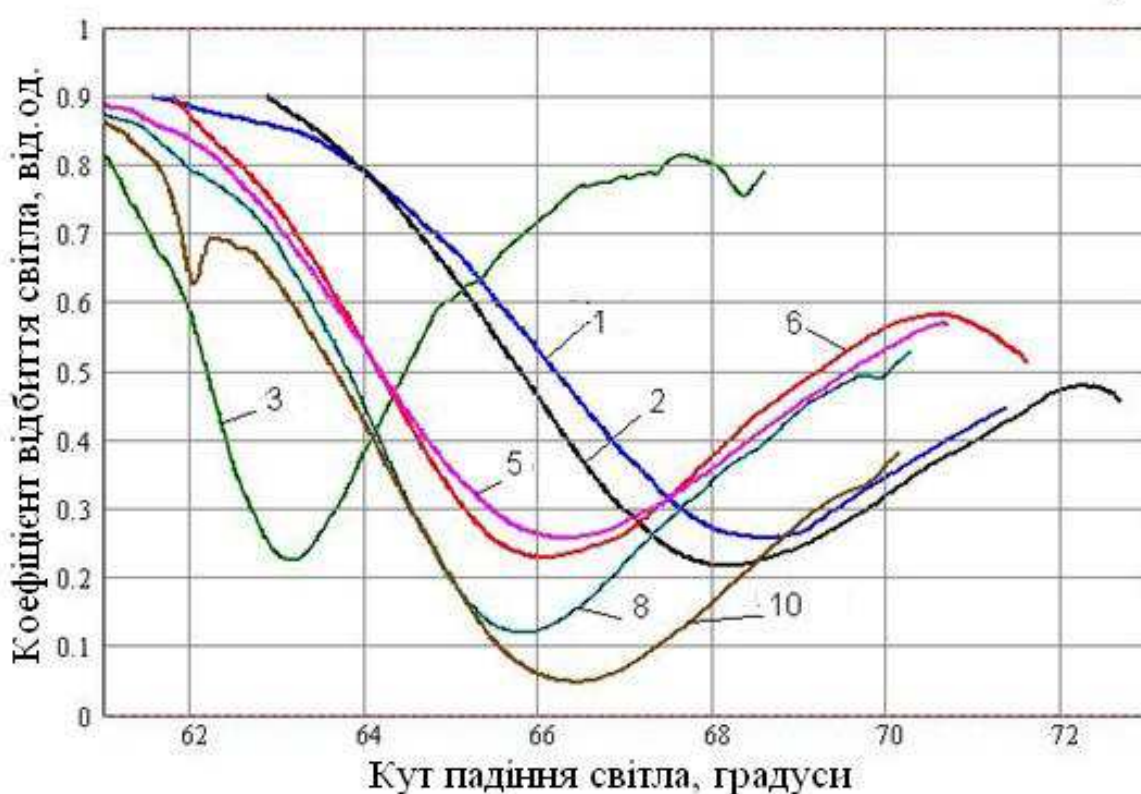


Рис. 5.16. Експериментальні залежності $R(\theta)$ для структур скло-Cr-Au¹-SiO_x та аналізу дистильованої води [18].

Ці результати корелюють з результатами теоретичного моделювання оптичних властивостей таких структур. Положення мінімуму ППР залежить також від товщини верхнього шару золота. Збільшення його товщини призводить також до зсуву кривих у сторону менших кутів падіння.

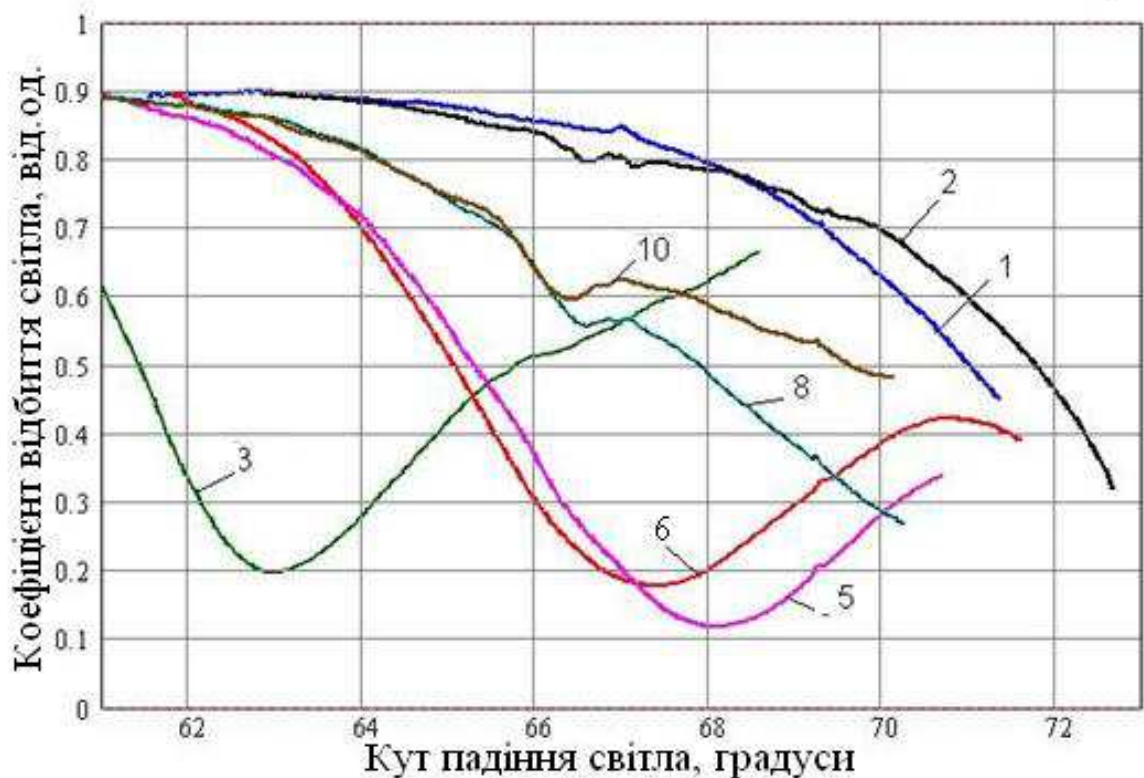


Рис. 5.17. Експериментальні залежності $R(\theta)$ для структур скло-Cr-Au¹-SiO_x-Au² та аналіту дистильованої води [18].

Результати чисельного аналізу та експериментальне дослідження визначили діапазон товщин додаткових діелектричних шарів, які дозволили отримати положення мінімуму $R(\theta)$ в межах кутів, доступних для вимірювання на приладі «Плазмон-6». Подальшим етапом експериментальних досліджень поруватих структур було визначення сенсорної чутливості запропонованих діелектричних структур та вибір оптимальних товщин цих структур.

Експериментальне дослідження сенсорної чутливості досліджуваних структур проводили на приладі «Плазмон-6» в режимі Multiple mode. Для визначення сенсорної чутливості структур виконували заміну дистильованої води розчином хлористого калію в протічній двоканальній кюветі, котра була розташована над досліджуваним зразком так, щоб забезпечувати контакт рідини зі структурою. Протічна кювета була оснащена трубками введення і виведення досліджуваної рідини. Зміна аналіту проводилася

перистальтичним насосом, приєднаним до вивідних трубок протічної кювети, а ввідні трубки приєднувались до резервуарів з аналізами (дистильованою водою та розчином хлористого калію). Кінетика зсуву мінімуму ППР записувалася за допомогою спеціально розробленої програми.

Було встановлено експериментально, що відгук структури при заміщенні аналіту в 1,3 рази більший за відгук на чистому золоті для того ж самого аналіту (Таб.5.4.).

Таблиця 5.4

Результати дослідження сенсорної чутливості ЧЕ з додатковим шаром SiO_x

№ зразка	Товщина шарів зразка, нм			Мінімум КППР, град		Зсув мінімуму, кут.хв.		Підсилення
	Au1	SiO_x	Au2	Зразок	Золото	Зразок	Золото	
2	35	140	30	68	63,3	3,6	4,5	0,8
				73				
3		115	30	63	63,2	4,9	4,5	1,1
				63				
5		55	20	66,4	62,8	20,3	16	1,27
				68		16,6	15,5	1,07
6		55	20	66	62,9	8,2	5,9	1,39
				67,3		5,94	5,76	1,03
8		105	30	65,7	63,4	36,4	32,4	1,12
				71				
10		105	30	66,5	63,5	36,1	32,4	1,11
				72				

Аналогічні результати одержані і для інших зразків, причому найбільше підсилення має структура з найменшим за товщиною шаром SiO_x .

Це пов'язано з тим, що інтенсивність поля, створюваного поверхневим плазмоном, спадає по експоненті від внутрішньої поверхні золота і, як наслідок, на поверхні ЧЕ маємо меншу інтенсивність поля для більш товстої структури.

Таким чином, було експериментально показано, що рівень відгуку ЧЕ з додатковим шаром поруватого оксиду кремнію залежить від товщини додаткового шару і найбільший відгук виміряно при товщині 55 нм, що пояснюється максимальною напруженістю електричного поля на поверхні

чутливого елементу у порівнянні з більшими товщинами додаткового діелектричного шару [18, 23].

Крім того, було проведено визначення сенсорної чутливості до газоподібних речовин. Для вивчення кінетики адсорбції газоподібних речовин поруватими зразками оксиду кремнію в якості аналіту обирались прості сполуки, що містять азот та вуглець, а саме: етанол (C_2H_5OH), метанол (CH_3OH), аміак (NH_3) та ацетон (CH_3COCH_3). Та додатково були досліджені промислові розчинники: вайтспіріт та бензин марки «Калоша», оскільки вони широко використовуються в промисловості та побуті, а їх пари є також небезпечними для здоров'я людини.

Для визначення сенсорної чутливості ЧЕ з додатковим діелектричним шаром виконували заміну шприцевим насосом кімнатного повітря парами відповідних сполук у вимірювальній двоканальній кюветі, котра була розташована над ЧЕ так, щоб забезпечити контакт газової суміші з поруватою плівкою оксиду кремнію. Товщина поруватого оксиду кремнію становила 140 нм для забезпечення максимальної абсорбції аналіту. Для порівняння сенсорної чутливості ЧЕ з додатковим діелектричним шаром та без нього спочатку була проведена аналогічна процедура заміщення аналітів для ЧЕ без додаткового шару поруватого оксиду кремнію (Рис. 5.18). Селективність чутливого елементу без додаткового діелектричного шару не висока: відношення між найбільшим і найменшим відгуком, відповідно вайтспірітом та ацетоном, становить приблизно 3 рази. Крім того не можливо відрізнити відгуки парів аналітів, оскільки вони майже ідентичні, а саме: метанола та ацетона, вайтспіріта та аміаку.

При порівнянні рівнів відгуку чутливого елемента з додатковим діелектричним шаром поруватого оксиду кремнію та чутливого елемента без додаткового шару було встановлено, що величина відносного збільшення (підсилення) відгуку чутливого елемента додатковим шаром залежить від типу аналіту і знаходиться в межах від 6 до 30 (Рис. 5.19).

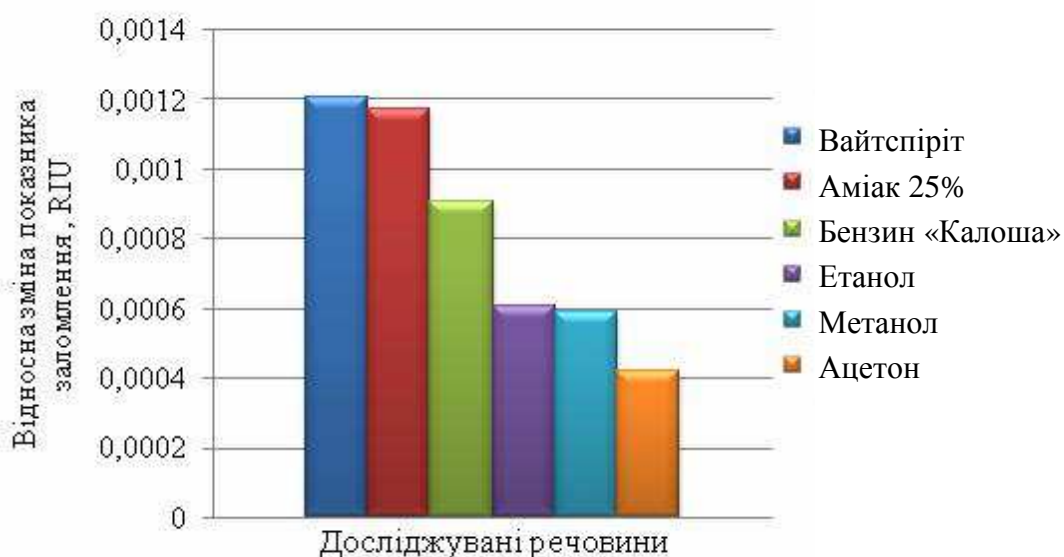


Рис. 5.18. Рівень відгуку золотого ЧЕ на насичені пари аналітів.

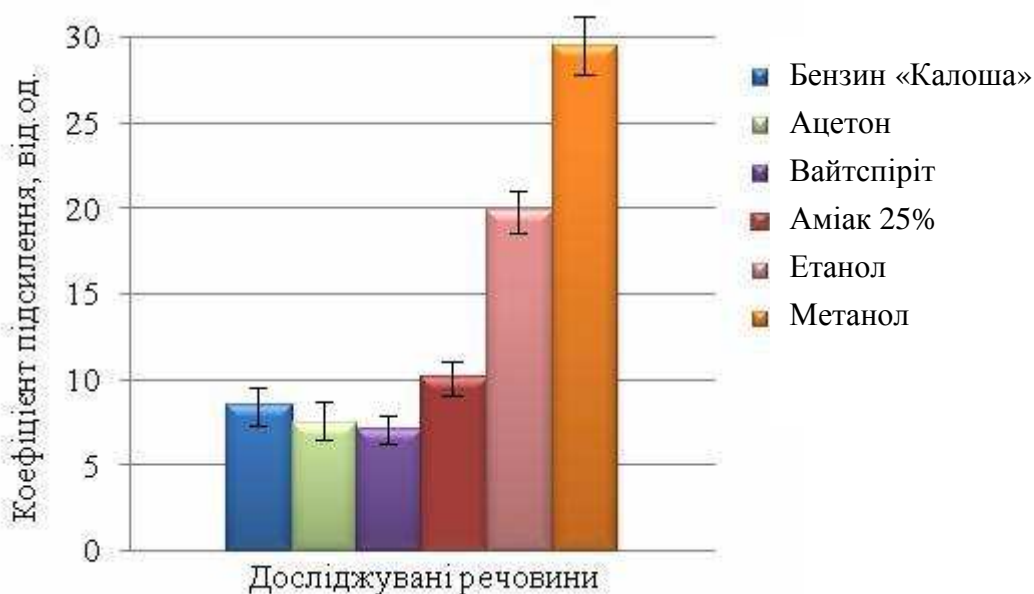


Рис. 5.19. Підсилення відгуку ЧЕ з додатковим шаром поруватого оксиду кремнію на насичені пари аналітів.

Це означає, що використання додаткового діелектричного шару може забезпечити селективність чутливого елементу.

Оптимізація довжини хвилі збудження поверхневих плазмонів

Для досягнення максимальної чутливості рекомендується використовувати джерело з довжиною хвилі в діапазоні $\lambda = 700 \div 1000$ нм [24].

Але перехід у інфрачервону область спектру має такий суттєвий недолік, як збільшення температурного впливу на аналіт внаслідок нагріву та здорожчання приладу через потребу у досить коштовних матеріалах, прозорих в ІЧ-діапазоні. Тому була поставлена задача визначити оптимальну довжину хвилі збудження з точки зору максимальної чутливості та мінімального впливу на аналіт. Для вирішення цієї задачі були визначені обмеження по вибору довжини хвилі збудження:

1. Динамічний діапазон вимірювання зміни ПЗ аналіту в режимі Slope має бути не менше $\Delta N_a = 10^{-5} \dots 10^{-3} \text{ RIU}$;
2. Абсолютна похибка апроксимації $\delta N_\lambda (\lambda) < 3 \cdot \delta N_\lambda (650)$, менше $3,1 \cdot 10^{-5}$;
3. Чутливість в режимі вимірювання Multipl $S_0 (\lambda) > 0,9 \cdot S_0 (650)$;

Для визначення динамічного діапазону вимірювання ППР-приладом було проведено чисельний розрахунок чутливості при зміні показника заломлення аналіту для чотирьох значень зміни показника заломлення аналіту, а саме: $dn_{A1} = 1 \cdot 10^{-5}$, $dn_{A2} = 1 \cdot 10^{-4}$, $dn_{A3} = 1 \cdot 10^{-3}$ та $dn_{A4} = 1 \cdot 10^{-2}$. Результати чисельного моделювання показали, що в режимі вимірювання Slope спостерігається обмеження діапазону вимірювання зі збільшенням довжини хвилі внаслідок звуження лінійної ділянки лівого схилу характеристики відбиття, на якому проводяться виміри (Рис. 5.20). Для $dn_{A3} = 1 \cdot 10^{-3}$ при довжинах хвиль, більших за 950 нм, спостерігається спад чутливості в результаті виходу робочої точки за межі лінійної ділянки схилу ППР кривої. Тому маємо обмеження спектру: 650...950 нм.

Друге обмеження визначається з рис. 5.3 і визначає спектр 750...1300 нм.

Третє обмеження визначається з рисунку 5.4 і визначає спектр 650...900 нм.

Враховуючі усі обмеження, діапазон допустимих довжин хвиль для вибору нового лазера становить 750...900 нм.

Оптимальну довжину хвилі збудження обираємо з середини цього діапазону довжин хвиль. Такою довжиною хвилі є 850 нм [25].

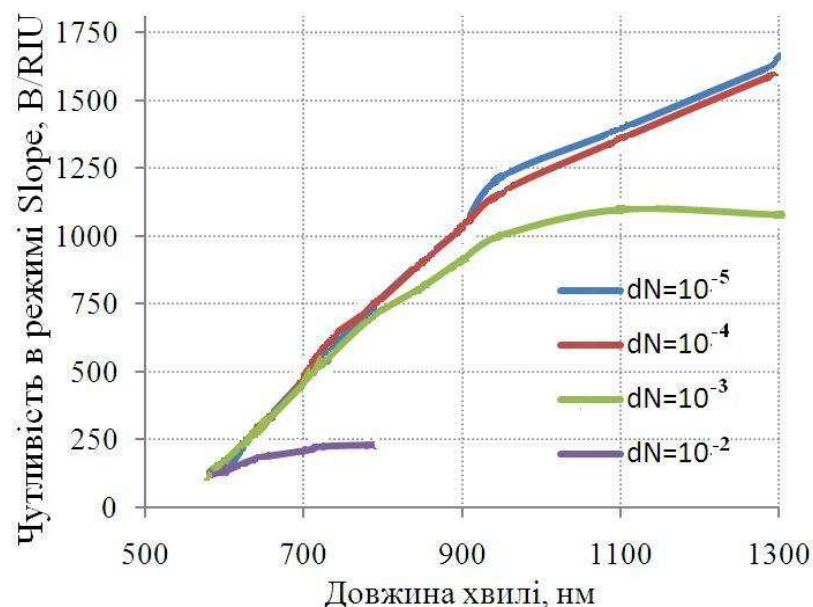
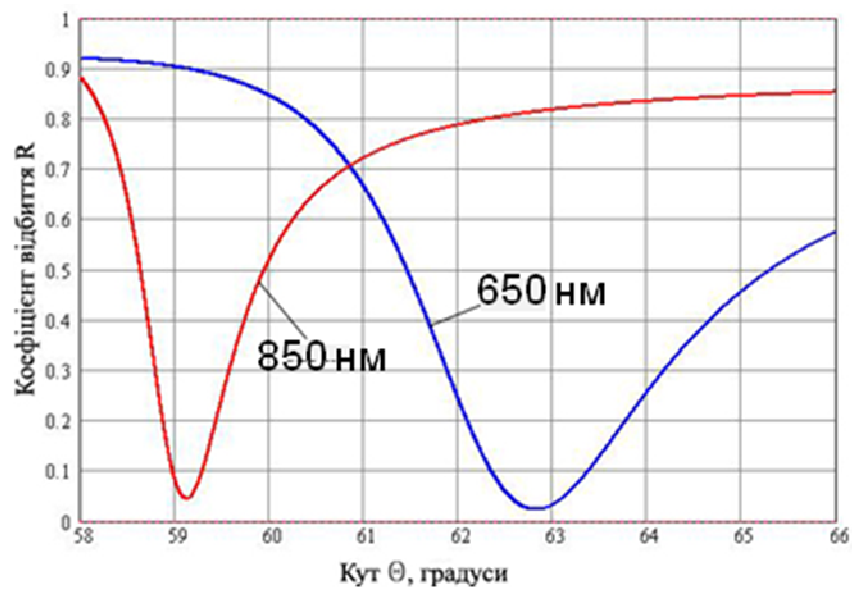


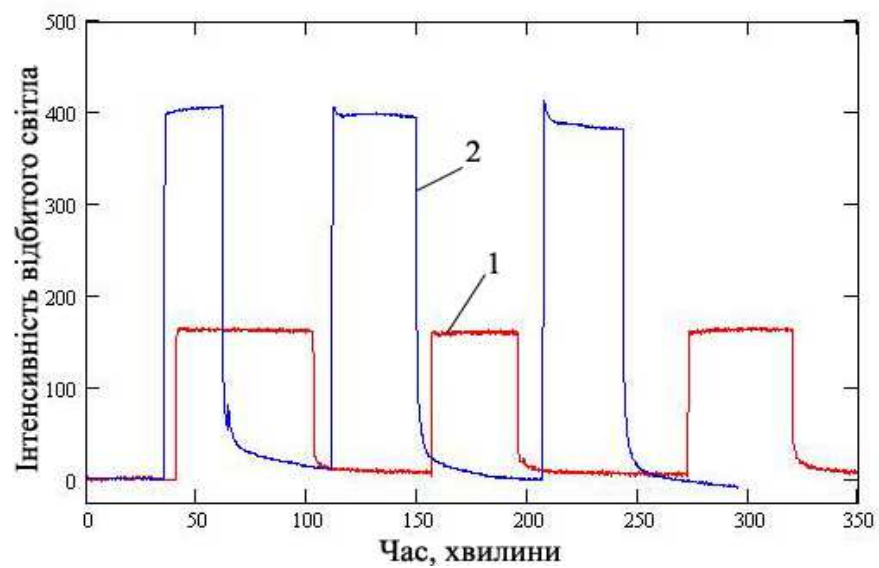
Рис. 5.20. Результати чисельного моделювання залежності чутливості S_R ППР-приладу в режимі Slope від довжини хвилі збудження при зміні показника заломлення аналіту в межах від 10^{-5} до 10^{-2} .

Для перевірки теоретичних розрахунків виконаних в підрозділі 5.1. цієї книги та результатів оптимізації довжини хвилі збудження ППР в приладі було виконано заміну лазера з довжиною хвилі 650 нм на лазер з довжиною хвилі 850 нм. Під час виконання експерименту у вимірювальній кюветі приладу виконували заміщення дистильованої води на 9% розчин хлориду натрію в дистильованій воді. Спочатку вимірювали характеристики відбиття $R(\theta)$ при існуванні ППР для відповідних аналітів, а потім кінетику в режимі Slope (Рис. 5.21).

Експериментально було встановлено, що збільшення довжини хвилі лазера приладу з 650 нм до 850 нм забезпечило зменшення абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналіту в 5,5 разів: від $\pm 6,2 \cdot 10^{-5}$ до $\pm 1,1 \cdot 10^{-5}$ та збільшити чутливість приладу в 2,4 рази: від 5,2 В/град до 12,5 В/град.



а)



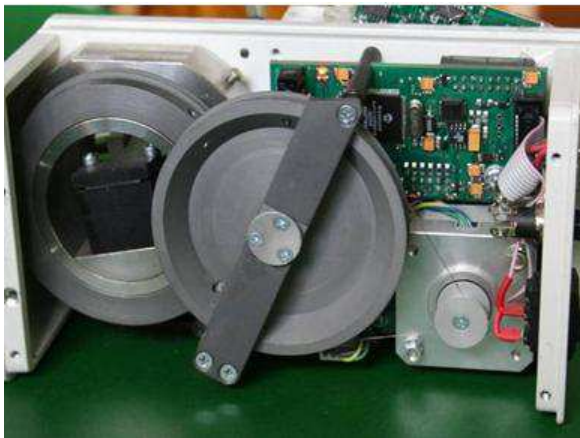
б)

Рис. 5.21. Експериментальні залежності $R(\theta)$ (а), кінетика заміщення дистильованої води розчином хлористого натрію (б) для довжин хвиль лазера 650 нм (1) та 850 нм (2).

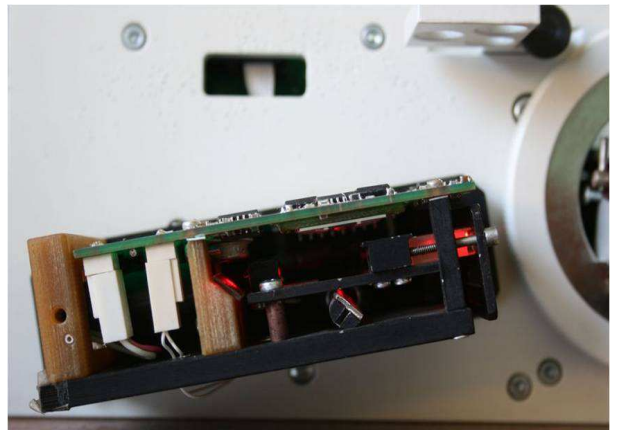
Так як збільшення довжини хвилі дало корисний ефект, то подальші дослідження виконувались на модернізованому ППР-приладі серії «Плазмон» з довжиною хвилі 850 нм.

Зменшення температурного впливу на вимірювання приладу

Для зменшення впливу температури була поставлена задача визначити елементи конструкції приладу «Плазмон-6», котрі є основними джерелами теплового випромінювання. Для вирішення цієї задачі було розроблено спосіб визначення основних джерел теплового випромінювання елементів конструкції приладу термографічним методом [26, 27]. Для реалізації запропонованого способу була виконана термографія елементів конструкції приладу «Плазмон-6» тепловізійною камерою зі спектральним діапазоном 2-5,3 мкм та межею детектування 0,07°C, розробленою в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Для визначення зон нагрівання елементів конструкції приладу «Плазмон-6» було знято захисні кожухи корпусу приладу та з оптичного блоку, в котрому знаходиться напівпровідниковий лазер (Рис. 5.22).



а)



б)

Рис. 5.22. Фотографічні зображення тилової сторони приладу (а) та його оптичного блоку (б) без захисних кожухів.

Була зроблена термограма приладу у вимкненому стані (Рис. 5.23, а) та під час вимірювання (Рис. 5.23, б).

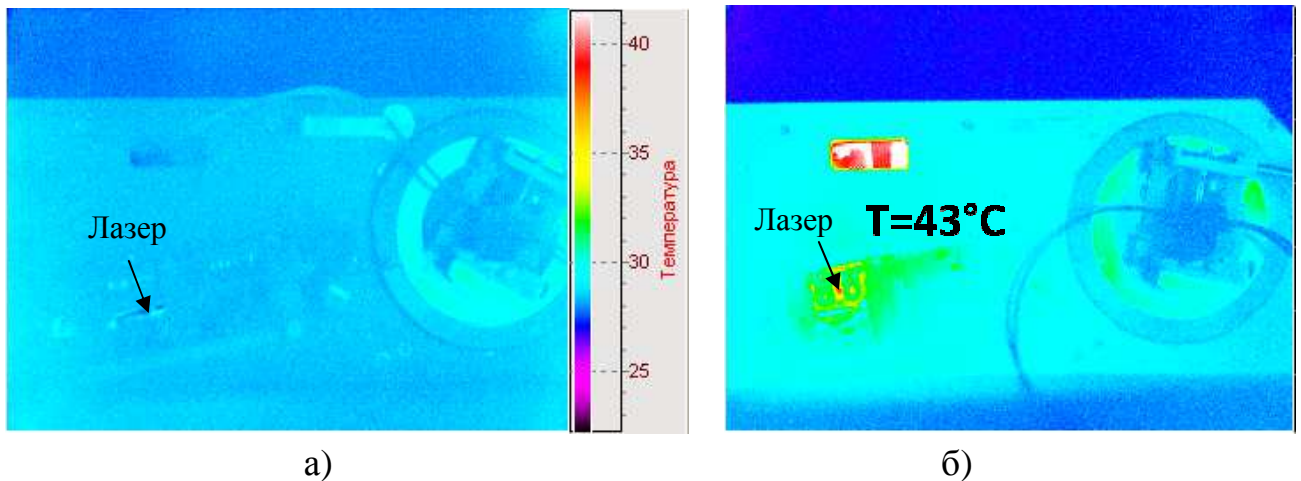


Рис. 5.23. Термографічні зображення найбільш нагрітого елемента (напівпровідникового лазера) фронтальної сторони приладу у вимкненому стані (а) та під час вимірювання (б).

Термографія була виконана при температурі робочої зони $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Калібрування камери виконували шляхом термографії зразків абсолютно чорного тіла. З термографічних зображень фронтальної та тилової сторін приладу визначено найбільш нагріті зони елементів конструкції приладу: зона напівпровідникового лазера блоку випромінювання (Рис.5.23.) та зона плати керування з мікропроцесором блоку керування (Рис. 5.24, а).

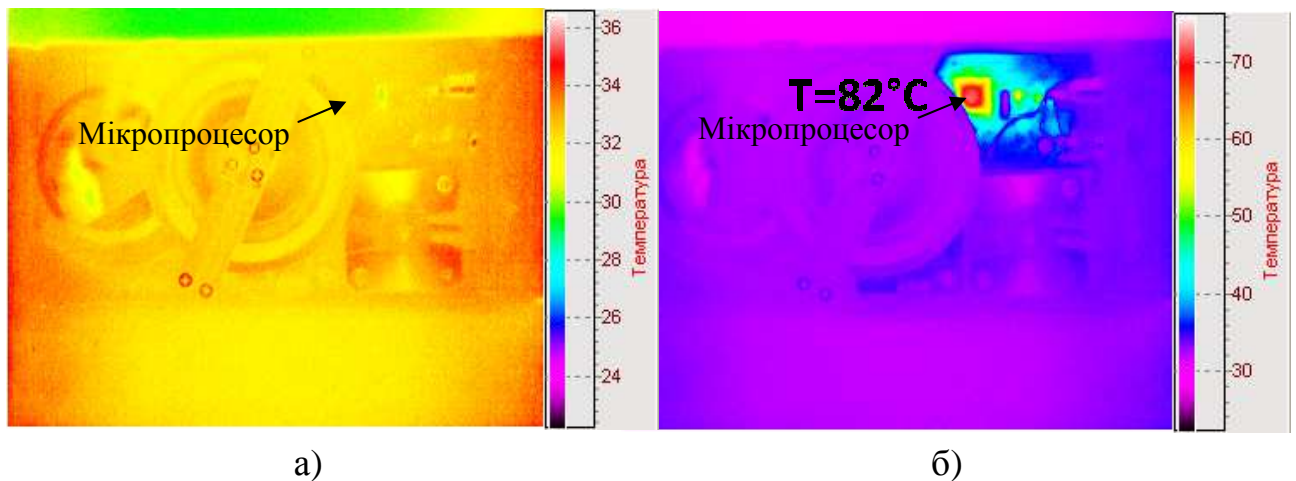


Рис. 5.24. Термографічні зображення найбільш нагрітого елемента (мікропроцесора) тилової сторони приладу у вимкненому стані (а) та під час вимірювання (б).

Основними джерелами тепловиділення елементів конструкції ППР-приладу є напівпровідниковий лазер та мікропроцесор.

Для оцінки значення абсолютної температурної похибки $\delta N_{\text{КС}}$ приладу «Плазмон-6» було задано наступні умови та обмеження:

1. Абсолютну температурну похибку вимірювання визначали в режимі вимірювання Multiple.
2. Процедура вимірювання передбачає арифметичну операцію усереднення результату по k одиночним вимірюванням. Процедуру з послідовних k -вимірювань та тривалістю τ_a було визначено актом вимірювання.
3. Величину зміни температури було визначено експериментально під час вимірювання кутового зсуву мінімуму кривої ППР кута відповідного аналіту. У якості аналіту використовували дистильовану воду та кімнатне повітря.

Експериментально було визначено температурний дрейф робочої точки в режимі Multiple. При цьому зміна температури аналіту становила 5 К від 296 К до 301 К. При такій зміні температури дрейф робочої точки для повітря становив 26,3 кут.сек./К, що відповідає зміні ПЗ аналіта $-88 \cdot 10^{-6}$ RIU/К. Часовий дрейф робочої точки при цьому складав $-7 \cdot 10^{-6}$ RIU/хв. По виміряним даним було визначено швидкість зміни температури, а саме 0,08 К/хв. Приймаємо, що акт вимірювання складає 20 одиночних вимірів, тоді $\tau_a = k \cdot \tau_{\text{mm}} = 20 \cdot 3 = 60$ секунд. За час одного акту вимірювання температура аналіта T_A змінилася на величину $\Delta T_{\text{mm}} = 0,08$ К. Для води тепловий дрейф робочої точки становив 40,64 кут.сек./К, що відповідає зміні показника заломлення аналіта на величину $136 \cdot 10^{-6}$ RIU/К. Часовий дрейф робочої точки при цьому складав $24,7 \cdot 10^{-6}$ RIU/хв. Звідси маємо зміну температури приблизно 0,182 К/хв. Тому, за час одного акту вимірювання дистильованої води температура T_A змінилася на величину $\Delta T_{\text{mm}} = 0,608$ К.

Відповідні зміни температури аналіту та сенсора викликають абсолютну похибку вимірювання для повітря $\delta N_T = 7 \cdot 10^{-6}$ RIU та для води $\delta N_T = 2,5 \cdot 10^{-5}$ RIU. Для визначення загальної абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналіту було обрано значення $\delta N_T = 2,5 \cdot 10^{-5}$ RIU. Додатково

визначено рівень шумової доріжки виміряного сигналу в режимі Multiple при нормальних умовах - сигнал $N_{ш}$; $N_{ш} = 2,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$ RIU (5,4 кут. сек.).

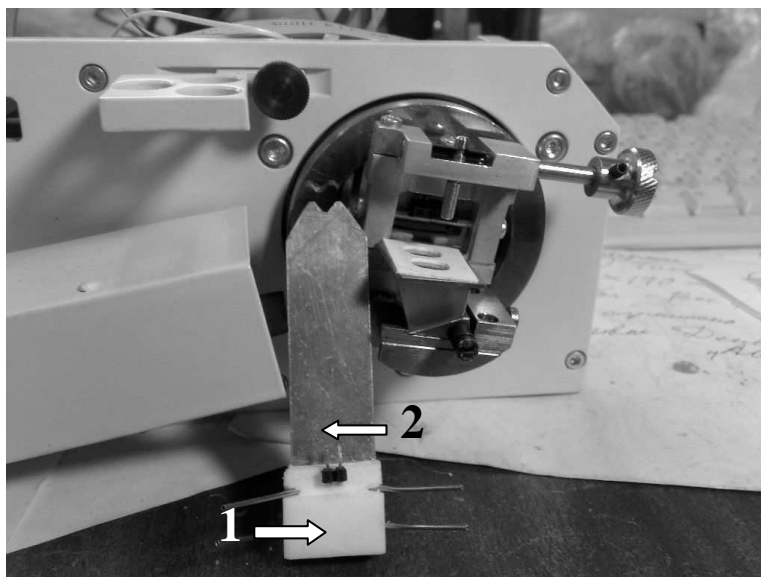
Аналіз літературних джерел [28, 29] та попередніх досліджень показав, що підвищення надійності і ефективності роботи ППР-приладу можна забезпечити стабілізацією температури вимірювальної кювети та збільшенням ефективності відводу тепла від найбільш нагрітих елементів конструкції приладу. Але такі заходи є недостатніми для збільшення точності вимірювання ПЗ аналіту, оскільки на величину абсолютної температурної похибки вимірювання ПЗ аналіту також суттєво впливає зміна температури напівпровідникового приладу, резервуарів з аналітом та буферним розчином. Це пов'язано зі зміною температури навколишнього середовища, нагрівом вимірювального обладнання і в деяких випадках з хімічними процесами в досліджуваних речовинах, при яких можливе виділення чи поглинання теплової енергії. В процесі вимірювання величина абсолютної температурної похибки ПЗ аналіту може змінюватись внаслідок різниці температур на початку вимірювання і по його закінченню. Експериментальні дослідження, показали, що основними джерелами теплового випромінювання елементів конструкції приладу є напівпровідниковий лазер та мікропроцесор на платі керування. Тому була поставлена задача виконати вдосконалення конструкції приладу для підвищення ефективності відведення тепла від основних джерел теплового випромінювання з метою зменшення величини абсолютної температурної похибки вимірювання ПЗ аналіту. Для вирішення цієї задачі було виконано модернізацію конструкції ППР-приладу та комплексну стабілізацію температури як всього приладу, так і ємностей з аналітом.

Для підвищення ефективності відведення тепла від основних джерел теплового випромінювання була зроблена модернізація конструкції приладу, а саме:

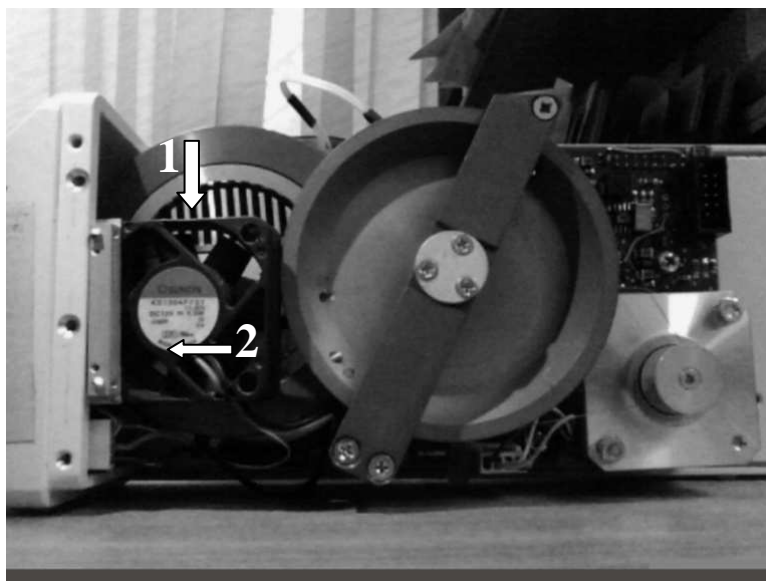
- 1) Встановлено радіатор через теплопровідну пасту КПТ-8 на корпус мікропроцесора;

2) Забезпечено тепловий контакт вимірювальної кювети з елементом Пельтьє для підтримання заданої температури аналіту шляхом нагрівання чи охолодження вимірювальної кювети.

Безпосередньо сама вимірювальна кювета (1) була розташована на мідній пластині (2), котра має високу теплопровідність та служить теплопровідним каналом від кювети до елемента Пельтьє (Рис. 5.25, а).



а)



б)

Рис. 5.25. Вигляд фронтальної (а) та тилової (б) частини приладу «Плазмон-6» після конструктивного вдосконалення.

Так як мідь у водних розчинах швидко окислюється з утворенням гідрооксидів, поверхня мідної пластини була покрита гальванічним методом шаром нікелю товщиною 20 ± 2 мкм. При встановленні вимірювальної кювети на ЧЕ пластина була щільно притиснена до робочої поверхні елемента Пельть'є. Термоконттакт між робочою поверхнею елемента Пельть'є та мідною пластиною забезпечувався за допомогою спеціальної теплопровідної гуми марки Thermo-800, яка має теплопровідність $1,5 \text{ Вт/(м}\cdot\text{К)}$. Температура вимірювальної кювети і аналіту контролювалась спеціально розробленою комп'ютерною програмою та регулювалась зміною сили та напрямку струму через елемент Пельть'є. З метою підвищення ефективності охолодження вимірювальної кювети, елемент Пельть'є було розташовано на радіаторі (1) (Рис. 5.25,б). Охолодження радіатора здійснювалось вентилятором (2).

Важливість стабілізації температурних режимів роботи ППР-приладу також пов'язана з необхідністю підтримання температури аналіту у відповідному діапазоні, що особливо важливо для таких біохімічних досліджень, як аналіз агрегації клітин крові людини під час запальних процесів в організмі людини [30].

На основі результатів дослідження основних конструкційних температурних похибок було також розроблено спосіб та виготовлено пристрій (термобокс) для стабілізації температури (рис.5.26), який дозволяє з абсолютною похибкою $\pm 0,5^\circ\text{C}$ підтримувати задану температуру у всьому об'ємі робочої камери [31]. Прилад «Плазмон-6» розміщували в робочій камері термобоксу, в якій підтримувалася постійна температура, значення якої можна було задавати відносно температури робочої зони в діапазоні від -5°C до $+42^\circ\text{C}$ з кроком $0,1^\circ\text{C}$. Об'єм робочої камери термобоксу становив 13 літрів, що дозволило розмістити в ній крім ППР-приладу перистальтичний насос і ємності з аналітом та буферним розчином.

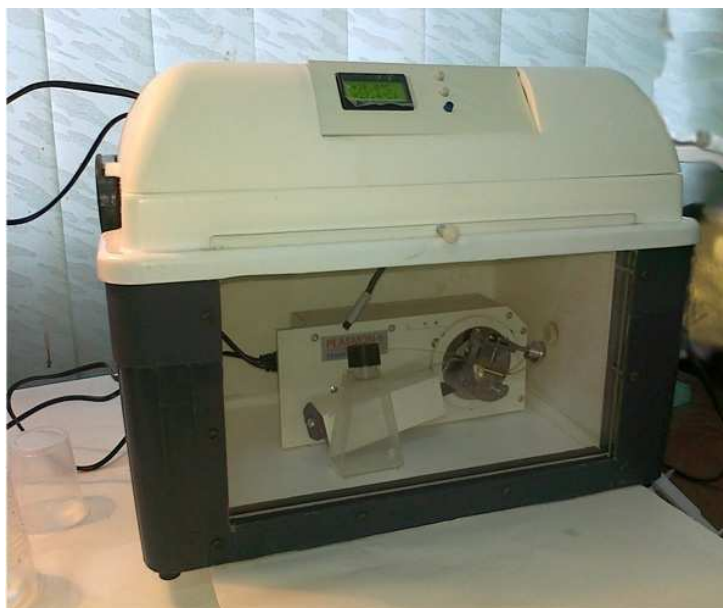


Рис. 5.26. Зовнішній вигляд термобоксу з приладом «Плазмон-6».

Для під'єднання до ППР-приладу шнурів живлення і керування в корпусі термобоксу були зроблені спеціальні ущільнені отвори, розташовані на боковій стінці корпусу термобоксу. Такий підхід дозволив мінімізувати абсолютну температурну похибку вимірювання ПЗ аналіту та додатково зменшити температурне навантаження на вимірювальне обладнання.

Експеримент по дослідженню впливу температури на точність вимірювання ПЗ аналіту виконувався в режимі Multiple приладу «Плазмон». Виміряні кінетики з використанням термостату показані на Рис. 5.27 та рис. 5.28. На Рис. 5.27 наведено результати вимірювань газоподібного середовища (кімнатного повітря), а на Рис. 5.28 – дистильованої води. По осі абсцис відкладено час спостереження у хвилинах, по осі ординат положення мінімуму кривої ППР у градусах.

Спочатку через кювету об'ємом 30 мкл пропускали повітря і вимірювали зміщення мінімуму кривої ППР протягом 95 хвилин при кімнатній температурі, при цьому вимірювання проводили, не розміщуючи ППР-прилад у термобоксі. Далі прилад розміщували в термостат і повторювали вимірювання ще протягом 85 хвилин при стабілізованій

температурі 24 °С. Потім виконували аналогічні вимірювання з дистильованою водою.

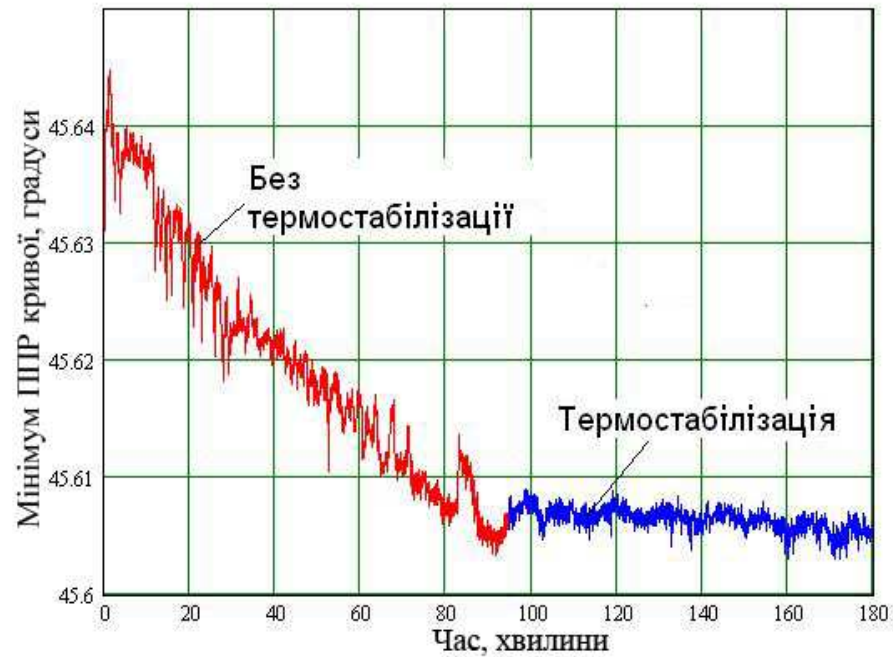


Рис. 5.27. Температурний дрейф мінімуму залежності $R(\theta)$ для повітря.

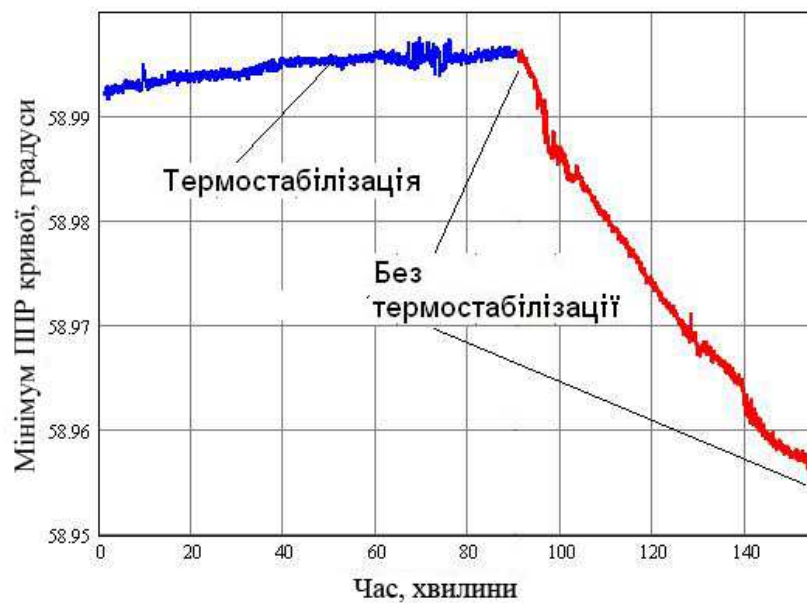


Рис. 5.28. Температурний дрейф мінімуму залежності $R(\theta)$ для води.

Прилад розташовували в термостаті при стабілізованій температурі 24 °С. Через кювету об'ємом 30 мкл прокачували дистильовану воду ($n=1,3313$) перистальтичним насосом, який теж був встановлений в

термобокс. Через 95 хвилин роботи приладу його витягли з термобоксу, і далі він працював ще 55 хвилин без термостатування. Середній рівень шуму базової лінії склав величину $\pm 1,9$ кут.сек. ($\pm 0,9 \cdot 10^{-5}$ RIU) у порівнянні з рівнем шуму без термостабілізації $\pm 6,02$ кут.сек. ($\pm 2,48 \cdot 10^{-5}$ RIU). Термостабілізація забезпечує зменшення рівня шуму у 2,7 рази, а відповідно і зниження рівня межі детектування у стільки ж разів. Експериментально було встановлено, що температурний дрейф робочої точки для рідкого аналіту як мінімум у 3 рази більший, ніж для газоподібного аналіту.

Зсув мінімуму кривої ППР в обох випадках був спричинений:

1. Зміною показника заломлення досліджуваного середовища (вода, повітря) внаслідок його нагріву приладом і навколишнім середовищем;
2. Зменшенням інтенсивності випромінювання та зміною довжини хвилі джерела збуджуючого світла (лазера).

Експериментально було визначено температурний дрейф робочої точки в режимі Multiple за час дослідження. Для повітря він становив $-3,8 \cdot 10^{-7}$ RIU/хв. Звідси було визначено швидкість зміни температури повітря за час вимірювання, а саме 0,08 К/хв. Приймаючи, що акт вимірювання складав 20 одиночних вимірів, загальний час акту вимірювання становив $\tau_a = k \cdot \tau_{mm} = 20 \cdot 3 = 60$ секунд. За час одного акту вимірювання ПЗ повітря змінився на величину $3,8 \cdot 10^{-7}$ RIU. Для води тепловий дрейф робочої точки становив 40,64 кут.сек./К, що відповідало зміні ПЗ дистильованої води на величину $136 \cdot 10^{-6}$ RIU/К. Часовий дрейф робочої точки при цьому складав $-7,6 \cdot 10^{-5}$ RIU/хв. Звідси було визначено швидкість зміни температури аналіту, а саме 0,182 К/хв. За час одного акту вимірювання дистильованої води її температура T_A змінилась на величину $\Delta T_{mm} = 0,608$ К. Відповідні зміни температури аналіту викликали абсолютну похибку вимірювання ПЗ для повітря $\delta N_T = 3,8 \cdot 10^{-7}$ RIU та для дистильованої води $\delta N_T = 0,76 \cdot 10^{-5}$ RIU, котрі значно менші за значення цих похибок $\delta N_T = 7 \cdot 10^{-6}$ RIU та $\delta N_T = 2,5 \cdot 10^{-5}$ RIU у випадку відсутності стабілізації температури.

Для визначення загальної абсолютної похибки було обране значення абсолютної температурної похибки вимірювання ПЗ дистильованої води $\delta N_T = 0,76 \cdot 10^{-5}$ RIU.

За результатами експерименту було встановлено, що термостабілізація вимірювального обладнання зменшує абсолютну температурну похибку вимірювання ПЗ аналіту [32] (Таблиця 5.5, Рис.5.29.).

Таблиця 5.5

Параметри складових загальної абсолютної похибки вимірювання ПЗ

Позначення	Значення, кут. сек.	Значення, RIU	Складова частина загальної, %
δN_a	13,39	$62 \cdot 10^{-6}$	46,3
δN_{KC}	7,46	$35 \cdot 10^{-6}$	26,1
δN_T	5,40	$25 \cdot 10^{-6}$	18,7
$\delta N_{\text{ч}}$	1,69	$7 \cdot 10^{-6}$	5,2
$\delta N_{\text{дп}}$	1,08	$5 \cdot 10^{-6}$	3,7

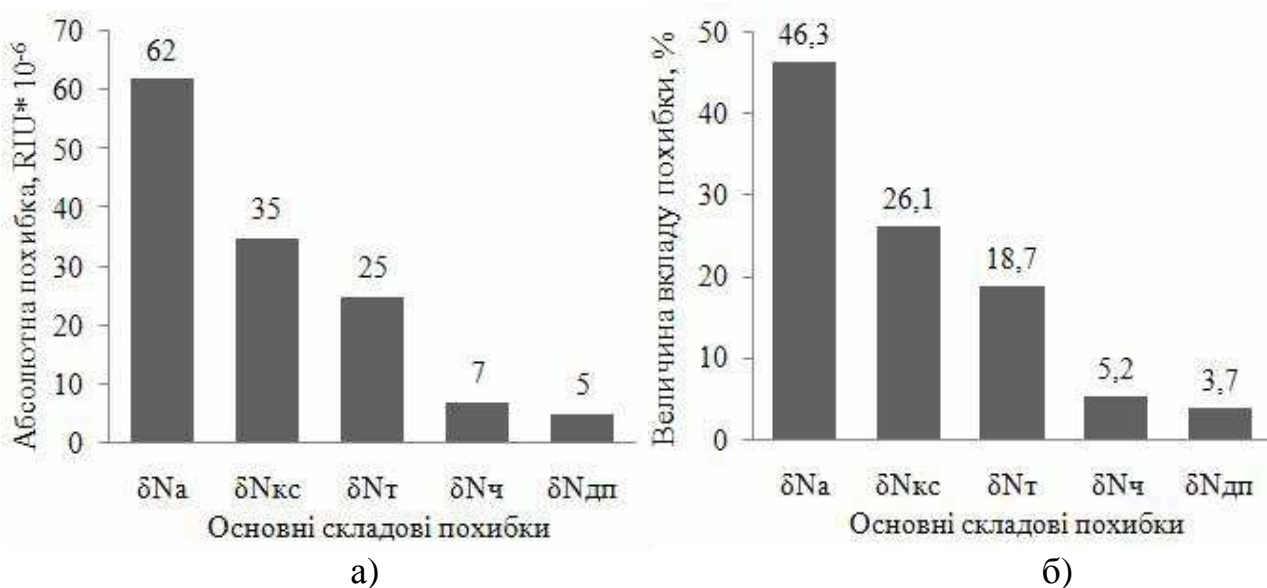


Рис.5.29. Значення складових загальної абсолютної похибки (а) та відносна величина їх вкладу в загальну абсолютну похибку (б).

На основі чисельного аналізу, виконаного вище, розраховано загальну абсолютну похибку вимірювання ПЗ аналіту та визначено вклад її складових. Загальна абсолютна похибка становить $\delta N = \pm 7,6 \cdot 10^{-5}$ RIU. Розраховано межу детектування приладу «Плазмон-6», яка становить $\Delta N_{\text{aMIN}} = 5 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$ RIU (зсув кривої ППР 10,8 кут. сек.) та визначена як $2 \cdot N_{\text{ш}}$ ($N_{\text{ш}} = 2,5 \pm 0,2 \cdot 10^{-5}$ RIU).

За результатами чисельного аналізу визначені основні джерела похибок вимірювання ПЗ аналіту приладом з кутовим скануванням. При цьому встановлено наступну послідовність величин вкладу кожного в загальну абсолютну похибку яка складає $\pm 7,6 \cdot 10^{-5}$ RIU, а саме:

- апроксимація вимірюної залежності $R(\theta)$ (46,3%);
- кінематична схема приладу з кутовим скануванням (26,1%);
- температура аналіту (18,7%);
- чутливий елемент ППР-сенсору (5,2%);
- нерівноважні процеси на межі поділу чутливий елемент-аналіт (3,7%).

Експериментально було визначено оптимальну довжину хвилі лазера з точки зору забезпечення максимальної точності вимірювання ПЗ аналіту та чутливості приладу, а також мінімізації впливу на оптичні характеристики аналіту. Оптимальна довжина хвилі становить 850 нм. Збільшення довжини хвилі лазера приладу з 650 нм до 850 нм забезпечило зменшення абсолютної похибки вимірювання ПЗ аналіту в 5,5 разів: від $\pm 6,2 \cdot 10^{-5}$ до $\pm 1,1 \cdot 10^{-5}$ та збільшення чутливості ППР-приладу в 2,4 рази: від 5,2 В/град до 12,5 В/град.

РОЗДІЛ 6

МОДИФІКАЦІЯ ПОВЕРХНІ ЧУТЛИВОГО ЕЛЕМЕНТУ ПРИЛАДУ ДЛЯ ПОТРЕБ БІОСЕНСОРИКИ

6.1. Підготовка поверхні чутливого елементу до іммобілізації

На початку свого розвитку в ППР-приладах для аналізу біологічних взаємодій застосовували фізичну адсорбцію білків до металевої поверхні чутливого елементу [1]. Проте, згодом було встановлено, що такий метод досліджень має низьку селективність і повторюваність результатів, оскільки неможливо контролювати як кількість адсорбованих молекул рецептора, так і якість адсорбції. Поверхневі плазмони збуджують в металевих плівках чутливих елементів з золота і срібла, котрі характеризуються спонтанною адсорбцією білків та інших молекул. Фізична адсорбція до металу має суттєвий недолік: втрату біологічної активності рецептора через не специфічне зв'язування, при якому відсутні активні центри на поверхні рецептора при фізичній адсорбції. Аналогічні результати по фізичній адсорбції рецепторів були отримані також в аналізах типу ELISA. Таке приєднання рецептору також до пластикових поверхонь характеризується низькою адсорбційною ємністю: було адсорбовано не більше 2-10% від загальної кількості молекул рецептора, котрі були задіяні в іммобілізації [2]. Ці ефекти можуть бути пояснені намаганням іммобілізованих молекул досягти найбільш вигідного термодинамічного стану, тобто максимальної ентропії. Пасивне зв'язування з поверхнею чутливого елементу також дає можливість неконтрольованого обміну іммобілізованими молекулами протягом циклу аналізу. Якщо немодифікована поверхня використовується для повторюваних циклів аналізу, ймовірність обміну буде і далі підвищуватись, що призведе до непередбачуваних результатів вимірювання. Тому були розроблені методи модифікації поверхні чутливого елементу проміжним шаром, який характеризувався як стабільною адсорбцією до металічної

поверхні чутливого елементу, так і «специфічно» зв'язуванням з рецептором для забезпечення високої адсорбційної ємності.

Покриття поверхні самоорганізованими шарами

Для мінімізації неспецифічної адсорбції було запропоновано спочатку адсорбувати на поверхню чутливого елементу функціональні групи для іммобілізації компліментарних до них рецепторів. Найбільш успішні методи функціоналізації поверхні металу засновані на концепції молекулярної саморганізації тіолів або дисульфідних молекул. Спонтанне утворення органічних моношарів дисульфиду на поверхні золота спочатку було показано Allara і Nuzzo в 1983 [3] в контексті моделей для досліджень сорбційних властивостей поверхонь металів. Утворення моношару можливе за рахунок взаємодії сірки з металом, в супроводі взаємодії сил Ван дер Ваальса між алкільними ланцюгами. При достатній довжині ланцюга отриманий моношар утворює щільно упаковану і дуже стабільну структуру, орієнтовану переважно по нормалі до поверхні металевої плівки чутливого елементу (рис. 6. 1) [4].

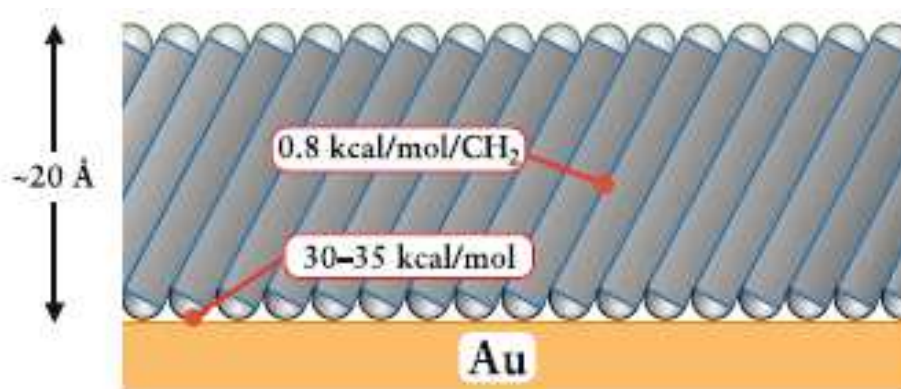


Рис. 6.1. Структура моношару алкантиолів на поверхні металевої плівки чутливого елементу та енергія їх взаємодії [4].

Нанометрові шари алкантиолів легко виготовити з комерційно доступних речовин, або принаймні можна синтезувати з відносною легкістю

[5]. Перші приклади застосування самоорганізованих моношарів (self assembled monolayer - SAM) для використання в біосенсорах були описані в кінці 1980-х і спочатку були розроблені для аналітичних приладів Biacore (Швеція) [6,7]. Тіолові алкани з довгим ланцюгом та кінцевими гідроксильними групами були розроблені для формування SAM на поверхні золота. Такі моношари можуть бути активовані для прямого зв'язування різних молекул, наприклад, при реакціях антиген-антитіло.

Можливість взаємодії алкільних тіолів з різними функціональними групами рецепторів робить SAM майже універсальним покриттям для забезпечення необхідних поверхневих властивостей чутливого елемента, тому вони широко застосовуються в лабораторній практиці при дослідження біомолекулярних реакцій [5, 8, 9]. Наприклад, на початку застосувань SAM [6, 7], алкільні тіоли застосовувались, щоб забезпечити високу гідрофільність поверхні чутливого елемента, діючи в якості засобу для іммобілізації різних молекул, або безпосередньо, або за допомогою відповідних лінкерів.

Застосування гідрогелю декстрину

Навіть якщо поверхня чутливого елемента гідрофільна, її поверхнева шорсткість може викликати денатурацію або порушення активності білків, які найчастіше використовують у якості рецепторного шару [10]. Крім того, ППР відчуває мас-залежну зміну показника заломлення аналіту на відстані у кілька сотень нанометрів від поверхні металевого шару чутливого елемента. Враховуючи такі особливості явища ППР, були розроблені процедури модифікації поверхні чутливих елементів, вироблених для компанії Biacore AB, які передбачали нанесення на поверхню тонкої (до 100 нм) плівки полімеру. Ця плівка складається з нерозгалужених одиниць глюкози, забезпечуючи високу гнучкість і розчинність декстрану у воді. Іммобілізація полегшується за допомогою епоксидної модифікації кінцевих гідроксильних SAM і подальшої реакції нуклеофільного декстрану в лужних умовах [6, 7, 11] (рис. 6.2.).

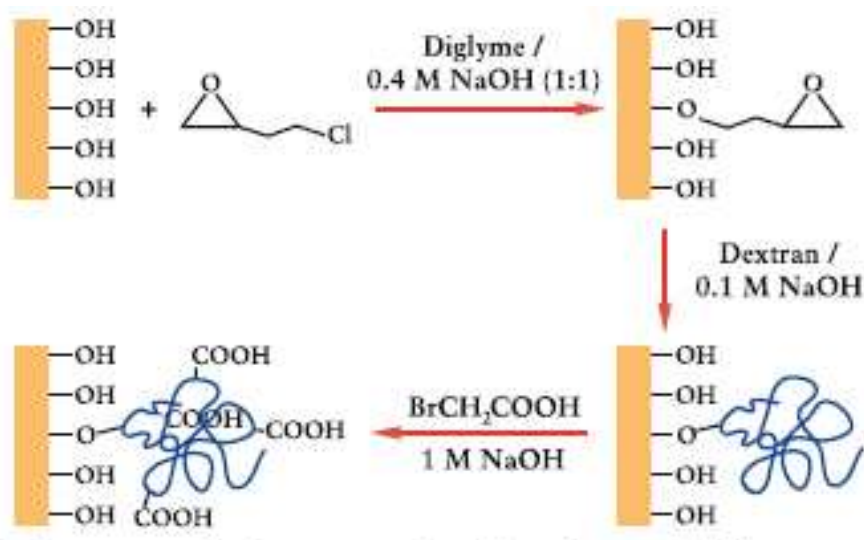


Рис. 6.2. Схема синтезу з карбоксиметилу декстринового покриття поверхні чутливого елементу [4].

Поверхня може бути додатково активована з придатних лінкерів для подальшої іммобілізації, що для введення карбоксиметильних груп являється універсальним варіантом. Вибравши різні розміри декстрану, починаючи з 10 кДа до 10^3 кДа, можуть бути створені поверхні, спеціально призначені для конкретних біологічних застосувань. Цей тип модифікації поверхні служить декільком цілям: гідрогель як шар забезпечує високу гідрофільність середовища, а полімер на основі глюкози підходить для чітко визначеної ковалентної іммобілізації білків, враховуючи їх широке хімічне застосування та дозволяє збільшити можливість зв'язування в кілька разів у порівнянні з плоскими поверхнями. Крім того, товщина декстринового покриття була оптимізована по відношенню до глибини проникнення у аналіт затухаючої хвилі поверхневого плазмону [12, 13].

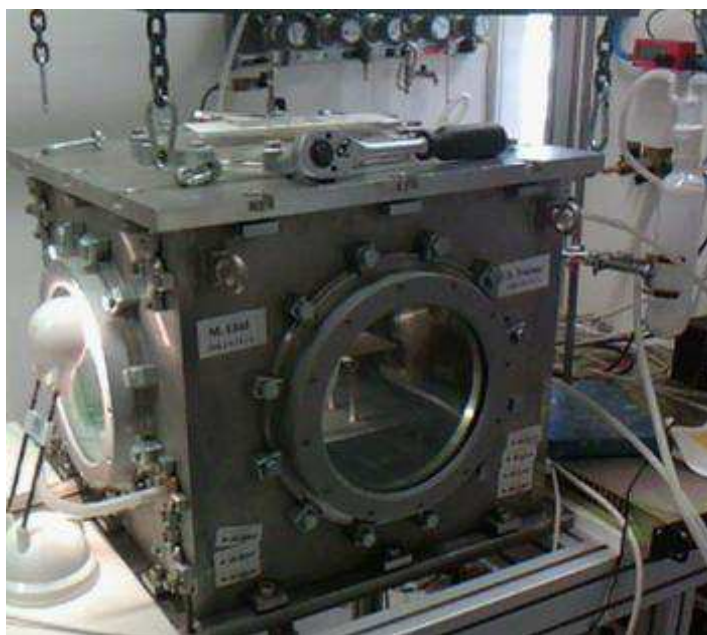
Зв'язування декстрану полімерних ланцюгів до поверхні чутливого елементу надає відкриту структуру, на якій іммобілізовані молекули можуть досягти стану твердого розчину, з певним рівнем свободи пересування в межах гідратованого шару [14]. Найбільш часто використовують карбоксиметіліровані похідні декстрину, оскільки вони мають більшу розчинність. Ступінь модифікації карбоксиметилцелюлози можна

модулювати для різних застосувань і вимог щодо адсорбційного об'єму поверхні чутливого елементу. Негативно заряджені шари карбоксиметилцелюлози можуть проявляти електростатичність фонового зв'язування основних з'єднань, яку необхідно враховувати при проектуванні процедури іммобілізації і аналізу.

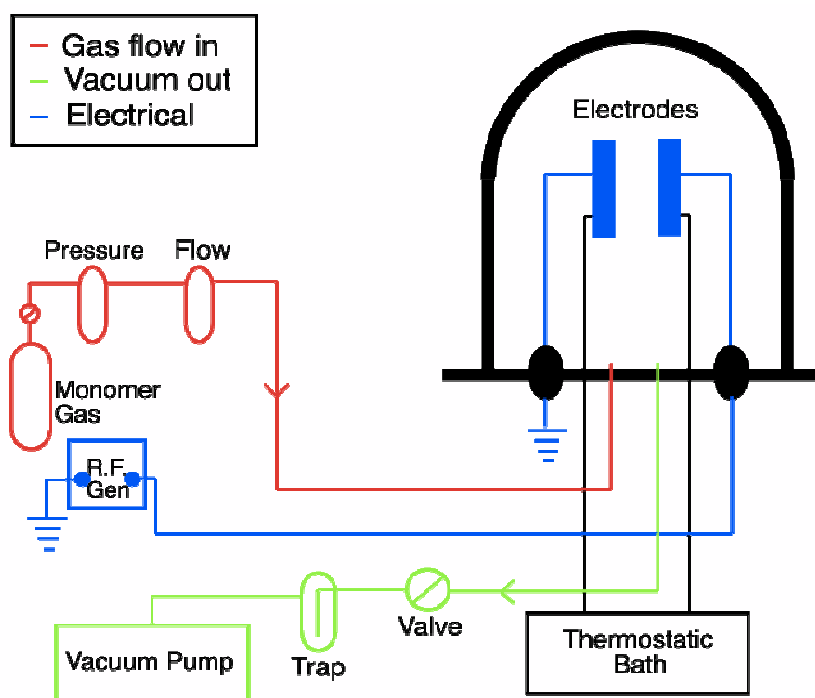
Інші гідрофільні полімери були задумані як альтернатива декстрану [7]. Наприклад, полівініловий спирт і похідні полиакрилової кислоти застосовуються для виявлення білків і вірусів [15]. Полі-L-лізин став популярним у якості функціонального покриття чутливих елементів для дослідження ДНК, через його високий позитивний заряд. Також практикується його приєднання до дериватизованих золотих поверхонь для подальшої модифікації з тіоловими реакційноздатними групами [16].

Перспективні методи модифікації поверхні

Як альтернативну технологію функціоналізації поверхні ЧЕ було запропоновано нанесення органічних полімерів в атмосфері плазми інертного газу. Спочатку ця технологія застосовувалась для функціоналізації поверхні кварцового мікробалансу [17]. Технологія функціоналізації передбачає використання спеціалізованого обладнання: високочастотного плазмового реактора (ВПР), структурна схема та зовнішній вигляд якого наведені на Рис. 6.3. ВПР складається з резервуару з мономером, датчика тиску мономера (Pressure), датчика швидкості потоку (Flow), ВЧ-генератора (R.F.Gen), вакуумного ковпака з електродами, вакуумного насосу з датчиком тиску та клапаном і системи стабілізації температури електродів. Для утворення функціонального покриття мономер запускали під ковпак ВПР разом з інертним газом-носієм (аргон) та прикладали високу напругу (3 кВ) до електродів з частотою 16 МГц. За рахунок високої напруженості поля між електродами та внаслідок малої відстані між ними (1,6 мм) відбувалась іонізація інертного газу.



a)



б)

Рис. 6.3. Зовнішній вигляд (а) та схема ВПР (б) [17].

Робота по дослідженню альтернативного методу функціоналізації поверхні ЧЕ проводилась в рамках проекту SCOPES в Університеті Масарика (м. Брно, Чеська Республіка). Співробітники університету розробили та сконструйовали ВПР, на якому було досліджено покриття на основі

органічних полімерів: циклопропіламіну (CРА) та малеїкангідриду (МА). Функціональні покриття наносили на скляні підкладки зі скла марки Ф-1 товщиною 1мм з попередньо нанесеним шаром золота товщиною 50 ± 2 нм. Покриття МА отримували у ВЧ-плазмі аргону при атмосферному тиску, швидкість нанесення покриття становила 11нм/хв. Зразки мали товщину покриття від 33 до 110 нм. Збудження поверхневого плазмонного резонансу на чутливих елементах з функціональним покриттям було досліджено на приладі «Плазмон-6» в лабораторії ІФН НАН України. Експериментально встановлено, що поверхневий резонанс може бути вимірний тільки для зразків з товщиною покриття до 80 нм, оскільки прилад має обмеження діапазону вимірювання кутового положення мінімуму ППР. Покриття CРА товщиною від 33 до 110 нм отримували у ВЧ-плазмі аргону при зниженому тиску (2-4 Па), швидкість нанесення покриття становила 4 нм/хв. Збудження поверхневого плазмонного резонансу на чутливих елементах з функціональним покриттям було досліджено на приладі «Плазмон-6» в лабораторії ІФН НАН України. Крім того, під час випробовувань покриття на стійкість в буферних розчинах з кислотністю від рН4 до рН9 функціональні покриття CРА виявилися не стійкими і здатними до розчинення та відшарування від поверхні чутливого елемента, в той час як функціональні покриття з МА виявилися стійкими і пройшли випробовування. Тому для подальших досліджень було обрано чутливі елементи з покриттям МА товщиною 33 та 66 нм (Рис. 6.4).

Додатково було проведено дослідження по іммобілізації рецепторів на функціоналізовані поверхні чутливих елементів ППР сенсорів та перевірено можливість взаємодії рецептора з аналітом [18, 19].

У якості рецептора було обрано імуноглобулін-G (IgG), а аналітом була його компліментарна пара сироватка до імонуглобуліну, отримана з крові хворих: антиімуноглобулін-G (serum Anti-IgG).

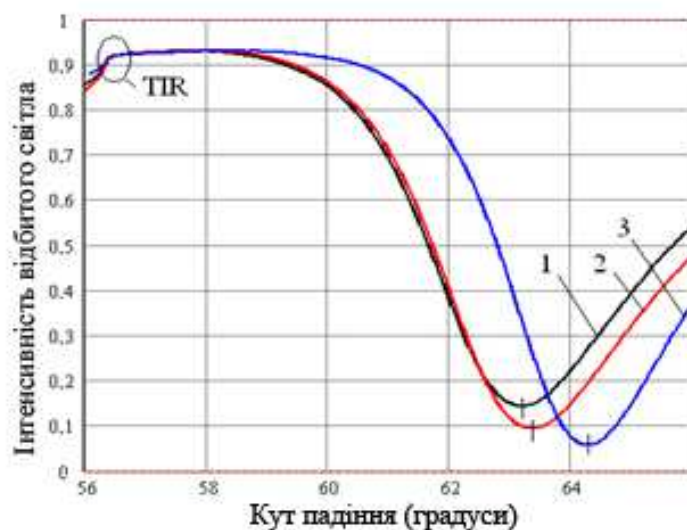


Рис.6.4. Експериментальні залежності $R(\theta)$ (а) для золотого ЧЕ без функціонального покриття (1) та з покриттям МА товщиною 33 нм (2) та 66 нм (3).

Дослідження взаємодії між рецептором та аналітом виконували на приладі «Плазмон-6» в режимі Multiple. Реакцію досліджували в обох каналах вимірювальної кювети приладу. Різниця була в тому, що в другому каналі (Рис. 6.5) виконували попередньо процедуру активації поверхні МА, для чого запускали в кювети розчин активаторів EDC/NHS.

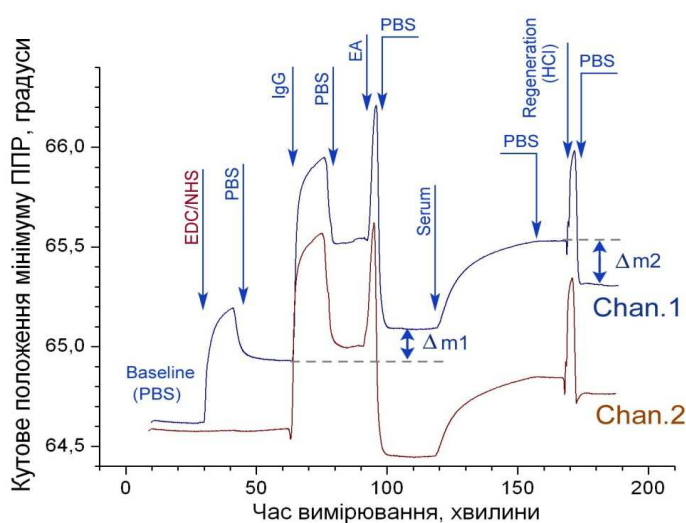


Рис. 6.5. Кінетика іммобілізації рецептора та його взаємодії з аналітом.

Послідовність етапів дослідження була наступною:

1. Вимірювали базову лінію з фосфатним буфером PBS (pH 7,2);
2. Проводили активацію поверхні EDC/NHS в другому каналі кювети приладу;
3. Імобілізували рецептор на поверхню після промивки буфером PBS;
4. Блокували неспецифічну реакцію етаноламіном (EA) після буферу PBS;
5. Після промивки осаджали аналіт на рецептор та знову промивали буфером;
6. Проводили регенерацію поверхні рецептора розчином HCl (50mM);
7. Остаточного промивали буфером оба канали кювети приладу.

За характером імобілізації, взаємодії рецептора з аналітом та регенерації можна зробити наступні висновки:

1. Активація поверхні функціоналізованого ЧЕ дозволяє отримати стійку іммобілізацію рецептора та майже однорідний шар, про що свідчить суттєвий приріст поверхневої маси Δm_1 , котрій відповідає поверхнева щільність рецептора 2,4 нг/мм². Отож, спостерігається висока адсорбційна ємність полімерного покриття. В той час як без активації рецептор не закріплюється на поверхні ЧЕ.

2. Відсутність активації поверхні призводить до неспецифічного зв'язування аналіту з ЧЕ за рахунок фізичної адсорбції. На активованій поверхні відбувається як специфічна, так і неспецифічна адсорбція. Специфічна адсорбція характеризується зворотнім процесом, викликаним регенерацією поверхні та відєднанням аналіту від рецептору (зменшення поверхневої маси Δm_1). Наявність неспецифічної адсорбції має наступні причини:

- Вихідні речовини рецептору і аналіту є не монокланальними, і тому, крім компліментарних пар, мають у своєму складі не компліментарні пари і домішки;
- Висока адсорбційна ємність функціонального покриття збільшує фізичну адсорбцію, незважаючи на блокування активних центрів етанол аміном.

Запропонований спосіб щонайменше у 50 разів продуктивніший за існуючі способи за рахунок зменшення часу отримання функціональної поверхні, у середньому з 5 годин до 6 хвилин, та низьковартісний, оскільки вихідні речовини набагато дешевші: існуючий спосіб функціоналізації алкантиолами потребує дві вихідні речовини 11-mercaptoundecanol та 11-mercaptoundecanol, вартість кожної з них в середньому становить 800 євро за грам. Вартість вихідних речовин для запропонованого способу функціоналізації поверхні ЧЕ становить в середньому 4 євро за грам.

Таким чином, застосування альтернативної технології функціоналізації ЧЕ є перспективним напрямком його модернізації для біохімічного застосування та має ряд переваг у порівнянні з існуючими методами функціоналізації поверхні, а саме: суттєво нижча вартість вихідних речовин та феноменальна швидкість нанесення полімерного покриття.

6.2. Імобілізація рецепторів на поверхню чутливого елементу

Методи імобілізації були послідовно розроблені на основі більш ранніх робіт по використанню процесів адсорбції, котрі використовували контрольовані ковалентні хімічні зв'язки, наприклад, в імунохімії і афінній хроматографії [20, 21]. Проте, мініатюризація робочих поверхонь чутливих елементів біосенсорів і можливість досягнення гетерогенних міжфазних умов, необхідних для імобілізації, викликала необхідність подальшого пошуку нових рішень для забезпечення надійної адсорбції рецепторного шару на поверхню чутливого елементу. Успішне використання цих методів сприяло прийняттю ППР-приладів в якості перспективного і широко розповсюдженого аналітичного інструменту.

Ковалентна імобілізація

Можливість створювати трансформовану функціональну групу на поверхні сенсора є привабливою концепцією для активації поверхні чутливого елементу в порівнянні з іншими стандартними методами.

Карбоксильні групи, можуть безпосередньо взаємодіяти з аміногрупами або перетворені для використання в хімічних способів зв'язування на основі тіолових реакцій, альдегіду і конденсації карбонової кислоти і методів введення біотин (Рис.6.6).

Карбоксиметіліроване декстран покриття може бути використане як для безпосереднього зчеплення, так і для приєднання інших функціональних груп.

Огляд літератури показує, що на сьогоднішній день найбільш широко впровадженою стратегією іммобілізації є створення поверхні карбоксиметилцеллюлоза-декстрану, яка використовується в приладах Biacore в поєднанні з методом зв'язування аміну [22].

Зв'язування з карбоксильними групами

Найбільш універсальний і широко використовуваний підхід передбачає зчеплення функціональних нуклеофілів з карбоксильними групами на поверхні сенсора. Поширеним нуклеофілом, який використовують в ППР-приладах є аміногрупа на основі лізину, але також використовують гідроксильні групи. Карбонові групи легко вводяться на декстринову поверхню або інші гідроксил-місткі поверхні через реакцію галогенуксусних кислот. У разі використання SAM шарів, можуть бути застосовані алкан меркаптани, які є ω -кінцевими карбоксильними групами. Для утворення ковалентно-амідного або складноефірного зв'язку між карбоксильною і аміною або гідроксильною групами, відповідно, найбільш часто використовується активація з карбодіімідними реагентами. Водорозчинні карбодіімідиди, такі як DCC (діціклогексилкарбодіімід), як правило, використовуються в органічній хімії, але для реакцій у водних розчинах, кращими є такі альтернативи, як EDC (1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіімідів) [23].

Метою використання карбодіймідів є створення реактивного проміжного продукту ацилізомочевини з карбоксильною групою, який потім взаємодіє з відповідним нуклеофілами. Процес зазвичай виконується в два етапи, з активацією з подальшою взаємодією, щоб уникнути реакції між карбодіймідами і імобілізованими молекулами. Проте, у водних розчинах реакційна здатність проміжного шару настільки висока, що гідроліз води швидко перетворює його знову в карбонову кислоту, якщо вона не захоплюється іншим конкуруючим нуклеофілом. Цей ефект можна подолати використовуючи суміші карбодіймідів і реактивного гідроксильного з'єднання, утворюючи активну складноефірну похідну, яка є стабільною протягом довгого часу: від кількох хвилин до кількох годин (Рис. 6.7.).

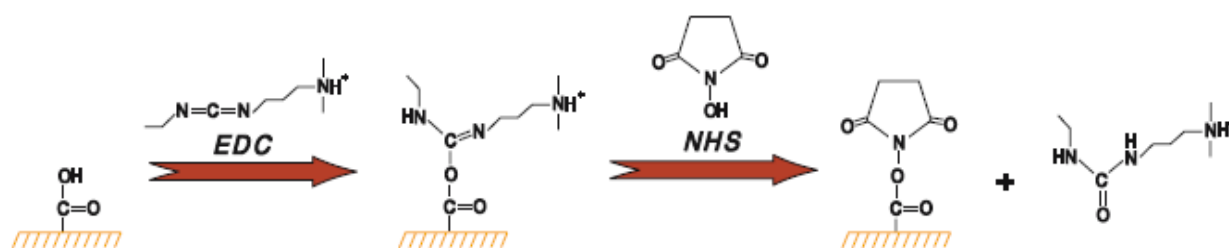


Рис. 6.7. Процедура активації карбоксильних груп на поверхні чутливого елемента ефіром EDC/NHS [4].

N-гідроксисукцинімід (NHS) є реактивним гідроксильним з'єднанням, який, як правило, змішують при високих концентраціях з EDC у воді. Обидва EDC і NHS діють як буферні агенти і мають кислотність близько 5-6 рН, забезпечуючи умови для оптимальної швидкості реакції формування NHS ефіру. Хоча інші ефіроутворюючі з'єднання, такі як нітрофенол і його похідні, також можливі для використання, але NHS зазвичай є кращим внаслідок його розчинності в воді, відносно низької токсичності і оптимальної реактивності для двоступеневих з'єднань. Були виконані дослідження з оптимізації активації і забезпечення умов іммобілізації білків на карбоксіметіліровані поверхні чутливих елементів, розроблених фірмою

Viacore [24].

Зчеплення з активними ефірами можуть бути проведені в різних умовах в залежності від молекулярного типу рецептору. Розчинення в водних розчинах, як правило, робиться при використанні легких лугів, наприклад, в карбонатних або боратних буферах з рН близькою до 8,5. В цих розчинах норма рН алкіламініонуклеофілу близька до свого природного рН і може конкурувати з гідролізом води. Цей метод є перспективним при дослідженні органічних молекул і пептидів, а також при іммобілізації білків для афінної хроматографії [25]. Альтернативний підхід був розроблений для іммобілізації білків до поверхні ЧЕ [26, 27]. Ця концепція спирається на електростатичну взаємодію білків з NHS-активованою карбоксильованою поверхнею, на якій фракція карбоксильних груп залишається без реакції. В умовах низької іонної сили буфера, де поверхня негативно заряджена і білок має позитивний заряд, висока локальна концентрація виходить на поверхню білка, що сприяє реакції нуклеофілів на білки через гідроліз ефірів водою. Відповідні необхідні умови для досягнення цього отримують, працюючи з ацетатними буферами з концентраціями 10 мМ при рН 4-6, де велика частка всіх білків позитивно заряджена [28]. Тривалість реакції становить 1-10 хв.

Метод електростатичної взаємодії може бути застосований до всіх типів поверхонь, які мають комбінацію реактивних груп і залишкових зарядів. Проте, найбільш успішні реалізації виявлені для 3D поверхонь, таких як карбоксіметілірований декстран. У цьому випадку залучення призводить до мультишарів з пов'язаного білка. Використання для калібрування ППР радіоактивно мічених білків з концентраціями до 50 мМ^{-2} показало можливість дослідження кількох моношарів з високою щільністю [29]. Крім того, ковалентний зв'язок виникає в дуже м'яких умовах, коли лише мала частка нуклеофільних груп на білці є реактивними, наприклад, аміногрупи на лізінових залишках. Це призводить до дуже небагатьох актів іммобілізації практично без з'єднання з поверхнею ЧЕ і високою ймовірністю збереження

активності. Білок А, іммобілізований в цих умовах, показав здібності зв'язування більше трьох молекул IgG на молекулі білка [28]. Таким же чином іммобілізовані молекули IgG антитіла показали можливість зв'язування антитіла до антигену (вірусом), що досягає величини 1,5 антигена на антитіло (75% активності антитіла) [30] Ці результати різко контрастують з результатами роботи, в якій було отримано низьку активність в межах 1-30% при іммобілізації моноклональних антитіл методом хроматографії [31].

У деяких випадках, може бути кращим зворотній підхід, з функціональними аміногрупами на поверхні сенсора і активованих карбоксильних груп. Ця стратегія може бути використана, коли молекулі вистачає відповідної реакційноспособних амінів або інших нуклеофілів, або коли нуклеофіл, як підозрюють, близько до місця зв'язування аналіту. Цей підхід є особливо зручним, коли працює з маленькими органічними молекулами і буде описано в подальшому. Амінні групи можуть бути іммобілізовані на сенсорній поверхні декількома способами. Зручний спосіб включає конверсію карбоксилатних поверхонь за допомогою активації EDC / NHS і подальшу реакцію з етилендіаміном (рис. 6.8).

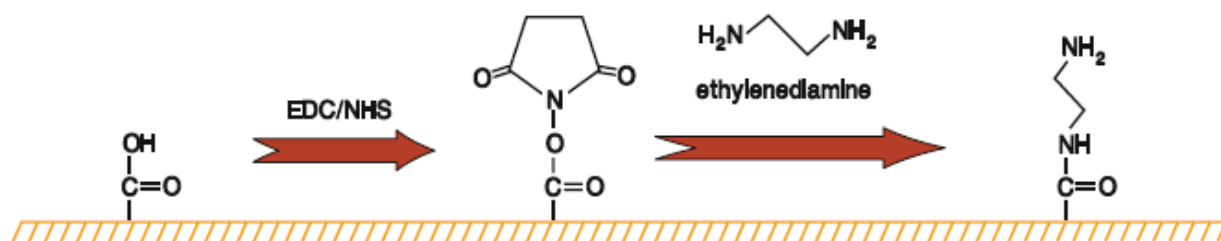


Рис. 6.8. Модифікація поверхні чутливого елементу амінними групами через EDC/NHS активацію та реакцію з етилен діаміном [4].

Такий метод функціоналізації поверхні чутливого елементу ППР-приладу особливо цінний при роботі з невеликими органічними молекулами. Амінні групи можуть бути введені на поверхню датчика декількома способами. Але найбільш ефективним способом є застосування

глютаральдегіду для активації поверхні металевого шару чутливого елементу, що є альтернативою застосування пари NHS/EDC.

Зв'язування за допомогою тіолів

Поверхні функціоналізовані групами первинного аміну зазвичай мають і далі реагувати безпосередньо після їх вироблення, а аміногрупи швидко втрачають реактивність при зберіганні в нормальних водних буферних умовах [32]. Вважається, що це відбувається шляхом формування карбонатів за допомогою реакції з двоокисом вуглецю, а також за допомогою явищ окислення. Хоча амінне поєднання з активованими карбоксильними групами є найбільш широко використовуваною формою ковалентної іммобілізації, існують альтернативні підходи, які можуть бути краще за певних обставин. Амінне поєднання може виконуватись на/або поблизу активного місця, або молекулі. Альтернативним поєднанням є тіолове з'єднання, яке спирається на функціональні можливості реактиву, який є тіол-селективним [33]. Як тіольні реактивоздібні групи найбільш часто використовують активні дисульфіди, такі як піридил дисульфідів або їх похідні, хоча також поширені альтернативні малеїміди і ацильні похідні галогениду. Ці тіольні групи можуть бути або іммобілізовані на поверхні ЧЕ і реагувати з молекулами тіолових реактивоздібних груп (рис. 6.9.), або виконувати реакцію в зворотному напрямку - з активною групою на поверхні ЧЕ і тіолами на поверхні молекул, які іммобілізуються (рис. 6.10).

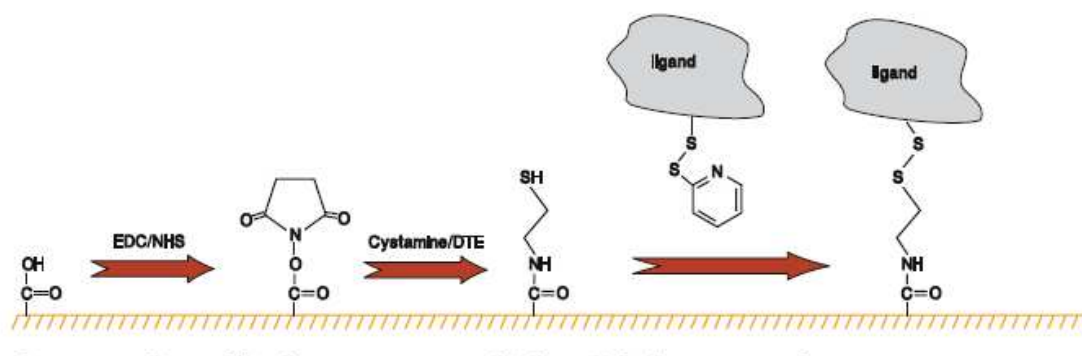


Рис. 6.9. Модифікація поверхні чутливого елементу за допомогою тіолових моношарів [4].

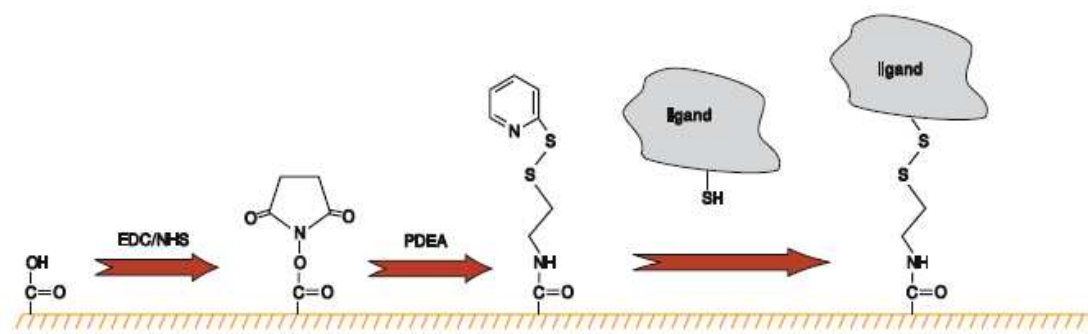


Рис. 6.10. Модифікація поверхні чутливого елементу тіолами з піридил-дісульфідними групами [4].

Різні реагенти для модифікації поверхні ЧЕ, засновані або на реактивних дисульфідах, малеїмідах, або ацилгалогенідах, які є комерційно доступними. Однією з переваг модифікації білка є можливість мінімізації кількості сайтів зв'язування, для уникнення блокування активного сайту або збереження низького рівня зв'язування. Таким чином, навіть якщо реагенти компліментарні до аміногруп, умови реакції можуть підтримувати збереження їх активності.

Дисульфіди можуть бути з'єднані в дуже м'яких умовах, і в разі, піридил дисульфідів, навіть в кислих буферах [34] і мають високу селективність до інших нуклеофілів. Дисульфідний зв'язок може пройти реакцію обміну з вільними тіоловими сполуками, які можуть обмежувати стабільність при певних умовах. Наприклад, буфери з додаванням тіолів, таких як меркаптоетанол, може викликати розщеплення зв'язку дисульфіду і дисоціації при зв'язуванні до іммобілізованого компліментарного партнера. Цей ефект також застосовувався для повторного використання модифікованих поверхонь. Після розщеплення з реактивним тіолом в помірно лужних умовах, залишкові тіолові групи на поверхні ЧЕ можуть бути використані для іммобілізації молекул, що містять дисульфіди [35].

Реакція малеїмідів і ацилгалогенідів протікає за формулою Міхаеля і утворює тіоефірний зв'язок з тіолами, який зазвичай більш стабільний, ніж дисульфідний (рис. 6.11). Реакції тіоефірного зв'язку зазвичай утворюються

при 7,5 рН - 8,5 рН, але з дещо нижчою селективністю, ніж реакції для дисульфідного зв'язку. За певних умов може виникати конкуренція з іншими нуклеофільними групами, і це необхідно враховувати при виборі типу іммобілізації.

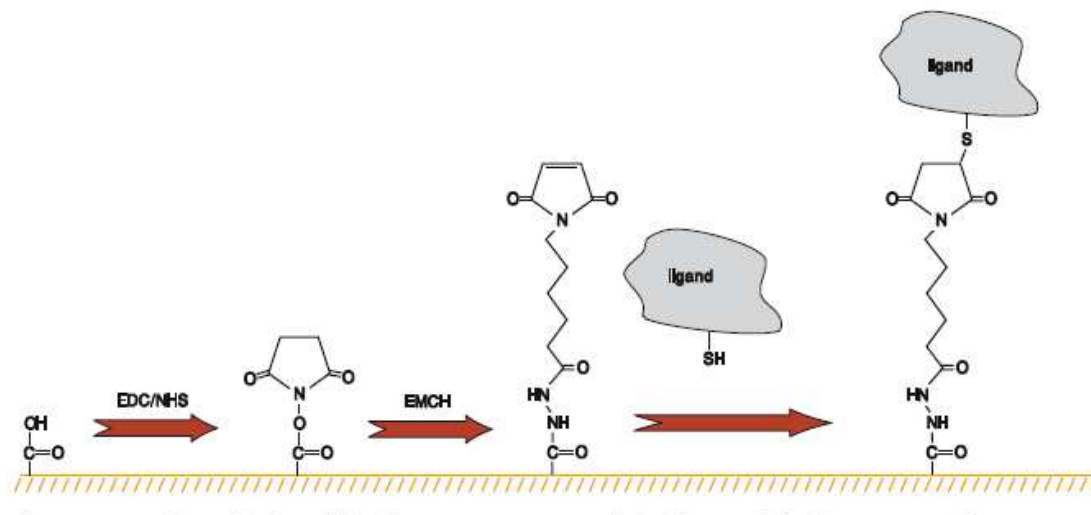


Рис. 6.11. Модифікація поверхні чутливого елементу толовими шарами модифікованого малеїмідом [4].

Надійність з'єднання тіолових груп залежать від їх концентрації та електростатичної взаємодії з активованою поверхнею ЧЕ, аналогічно амінному з'єднанню [33]. Через те, що реакція з'єднання відбувається в кислому середовищі, це з'єднання толових груп найкраще проводити за допомогою реактивоздатних піридил дисульфідів.

Зв'язування з альдегідними групами

Конденсація альдегідних груп в аміни і гідрази, яка базується на теорії Шиффа, була використана для іммобілізації глікопротеїнів в хроматографії [3, 36]. Метод заснований на використанні генерації альдегідів шляхом окислення вуглеводних залишків в білках. Стандартні протоколи доступні для м'якого окислення глюкози з використанням розчину періодату натрію. Залишки сіалових кислот, зокрема, отримують розщепленням легких формальдегідів екзоциклічним віцінальним діолом. Вуглеводи зазвичай не розташовані поблизу активного центру білка і, отже, отримане специфічне

з'єднання може забезпечити іммобілізацію молекул з високою зв'язуючою активністю. Так IgG антитіла добре підходить для іммобілізації на поверхні ЧЕ активованого альдегіду.

Хоча реакція Шиффа може проходити з аміногрупами, низька стійкість зв'язку гідрозиду в водних розчинах є кращою альтернативою для регенераційної іммобілізації. Гідрозид може бути введений на поверхню ЧЕ за допомогою реакції приєднання гідрозину або карбогідрозиду до карбоксильних груп після активації поверхні ефіром EDC/NHS (Рис. 6.12) [33]. Гідрозид-альдегід швидко утворює зв'язок і є відносно стабільним в нейтрально-лужних умовах, але повільно розпадається в кислому середовищі. Якщо необхідно, з'єднання може бути додатково стабілізоване відновленням ціаноборгідріда натрію при pH 4.

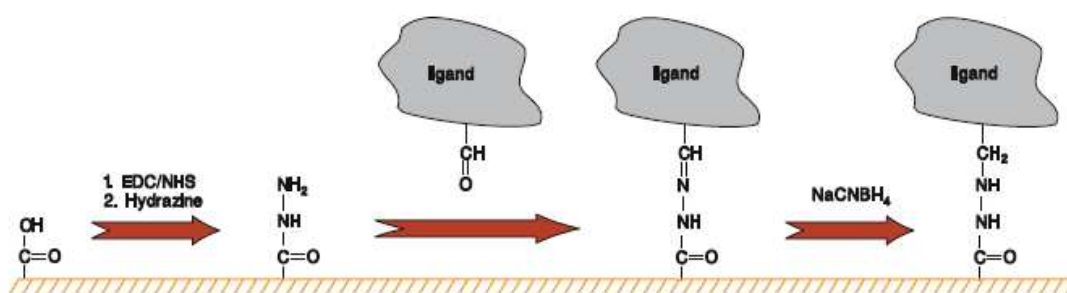


Рис. 6.12. Модифікація поверхні чутливого елементу альдегідними групами модифікованого гідрозидом [4].

Так само як у методів ковалентного зв'язування, зв'язування альдегідами добре підходять для приєднання на основі електростатичної взаємодії за умови, що поверхня ЧЕ має залишкові негативні заряди.

На відміну від спостережень, зроблених хроматографією "сайт-специфічна" іммобілізація антитіл за допомогою альдегідних груп та карбоксиметіл - декстранових поверхонь не суттєво поліпшує взаємодію антиген-антитіло [33]. Це, ймовірно, пов'язано з м'якими умовами, які можуть бути використані для амінного з'єднання та збереження його активності для полімерного шару декстрану. З'єднання альдегідів може бути альтернативою для молекул білків невеликих розмірів.

6.3. Молекулярні зв'язуючі елементи: білки, пептиди, олігонуклеотиди, малі органічні молекули та карбогідрати

Різні види молекулярних структур вимагають особливих вимог для досягнення оптимального з'єднання антиген-антитіло. Тому, необхідно розглянути специфічні властивості відповідних класів молекул, котрі використовують в якості взаємодіючих партнерів і запропонувати найбільш ефективні методи іммобілізації для кожного з них. Більш розширений загальний огляд різних молекул та їх взаємодію між собою наведено в роботі [26].

Білки

Білки є найбільш широко використовуваними партнерами при іммобілізації в дослідженнях на основі ППР, але вони не піддаються загальній стратегії іммобілізації. Спільною рисою є з'єднання поліпептидами, коли окремі амінокислоти представляють собою функціональні залишки, які можуть бути використані для іммобілізації на поверхні ЧЕ. Найвживанішими амінокислотами, а також їх відповідними функціональними групами є: лізин (- NH₂), цистеїн (- SH), аспарагін і глутамін (- COOH), серин і тирозин (-OH), і гістидин (імідазол). N-кінцеві амінокислотні залишки також є активними центрами для іммобілізації за рахунок наявності в них кінцевих аміногруп. Незважаючи на ці подібності білків, вони мають різні фізичні властивості, пов'язані з балансом заряду і його розподілом, розміром і термодинамічною стабільністю, що зробило майже кожен білок унікальним відносно умов іммобілізації.

Антитіла є найбільш однорідним класом білків і також є найбільш часто використовуваним складовим елементом рецепторів ППР-приладів. Антитіла також використовуються для захоплення різних молекул, або в якості рецепторів для визначення концентрації аналіту. Антитіла IgG-типу складаються з Fc - субодиниці і двох Fab- субодиниць, котрі утворюють в сукупності молекулу з масою 150 кДа [37]. Активні антигензв'язуючі області

локалізовані в Fab-субодиницях, а іммобілізація до поверхні ЧЕ в ідеалі повинна бути реалізована через активні центри Fc-субодиниці [37]. З огляду на розмір антитіл, зазвичай це не є проблемою, і вони є одними з найпростіших молекул для іммобілізації. Типові IgG антитіла містять 50-70 залишків лізину і, при використанні ковалентного зв'язування дає високу ймовірність для іммобілізації через активні центри Fc-субодиниці. Є також альтернативи, які використовують вуглеводні залишки, приєднані до Fc області. М'яке окислення цих глюкоз з періодатом натрію генерує альдегідні групи, які можуть реагувати за допомогою гідратида на поверхні ЧЕ. Інший спосіб для ковалентної іммобілізації включає розклад антитіл на Fab-фрагменти, використовуючи сульфгідрильну групу з залишками цистеїну. Сульфгідрильна група може бути використана для ковалентного зв'язування з селективними групами, такими як реактивні дисульфіди і малеїміди. Деякі підкласи антитіл також можуть бути нековалентно іммобілізовані через Fc області до білку А чи білкових молекул G. Антитіла являють собою клас білків, які зазвичай не створюють жодних проблем при іммобілізації.

Інші розчинні білки поведуться набагато більш гетерогенно ніж антитіла. Загальний підхід аналогічний, і першим обирається, як правило, метод ковалентної іммобілізації за допомогою нуклеофільних залишків, таких як аміно- і сульфгідрильні групи. Проте невеликий за розміром білок може бути більш сприйнятливий до дезактивації внаслідок більш високої ймовірності того, що функціональні групи, які беруть участь в з'єднанні розташовані найближче до місця взаємодії. Найчастіше використовують методи іммобілізації, котрі застосовують введення рекомбінантних тегів, таких як оліго-гистидин і інші короткі пептиди. Білки можуть зв'язуватися з іммобілізованими антитілами або іншими захоплюючими агентами, які специфічно розпізнають ці теги. Аналогічним чином, рекомбінантні білки, що містять більші домени, такі як злиті GST або MUS також можуть бути згенеровані.

Пептиди

З огляду на їх структурну схожість з білками, можна порівняти умови, котрі регулюють іммобілізацію пептиду. Залежно від складу пептиду, електростатична взаємодія може бути використано таким же чином, як і для білків. З'єднання, котре базується на амін- або тіол- активованій поверхні ЧЕ також може використовуватись у слаболужному середовищі, з використанням мілімолярних концентрацій пептиду. Для іммобілізації малих пептидів може знадобитися альтернативна стратегія. Наприклад, існує значний ризик того, що аміногрупи, котрі утворюються із залишків лізину або N-кінцевої амінокислоти беруть участь у зв'язуванні малих пептидів з взаємодіючим партнером. Тому рекомендується ретельний аналіз пептидної структури і оцінка активних центрів пептиду, котрі можуть прийняти участь у іммобілізації. Номенклатура синтетичних пептидів може мати більшу кількість активних центрів. Додаткові лізини, наприклад, можуть бути введені в область пептиду, який не залучений у взаємодію. Активні центри, які включають залишки цистеїну, є сприятливою альтернативою для іммобілізації на чутливий елемент модифікований тіолами [38]. Іншим варіантом є *biotinylate*-пептид. Таким чином можна отримати синтетичні пептиди, котрі можуть бути іммобілізовані на поверхню ЧЕ модифікованого стрептавідином.

Олігонуклеотиди

Олігонуклеотиди складаються з негативно заряджених нуклеотидних груп, які відносно стійкі до ковалентного зв'язування в м'яких водних розчинах. Хоча ефірні фосфатні групи можуть бути використані в реакції конденсації з нуклеофілами, такими як первинні аміни, реакція проходить повільно і гідроліз води проходить замість бажаною реакцією. Крім того, нуклеотидні залишки є слабкими нуклеофілами і не можуть бути використані в стандартних умовах зв'язування.

Найбільш поширеною альтернативою для іммобілізації олігонуклеотидів є використання похідних біотину. Це зручно робити зі стандартними реагентами для синтезу олігонуклеотидів. Ефективною є іммобілізація біотинізованого олігонуклеотиду на поверхню ЧЕ модифіковану авідином, що виконується в нейтральному буферному середовищі.

Нещодавно [39] було розроблено альтернативний метод, котрий використовує амінні похідні олігонуклеотидів для з'єднання з аналітом з попередньою активацією поверхні ЧЕ карбоксиметилем. Електростатичне відштовхування між негативними зарядами на поверхні ЧЕ і олігонуклеотидами зазвичай уповільнює таку реакцію взаємодії. Застосування позитивно зарядженого миючого засобу такого як гексадецилтріаммонієвий бромід дозволяє прискорити реакцію взаємодії. При нанесенні на поверхню ЧЕ карбоксиметілового декстрану, щільність олігонуклеотидних поверхонь може бути вдвічі більшою, ніж поверхня ЧЕ вкрита стрептавідином.

Малі органічні молекули

Хоча домінуючим є застосування білків для іммобілізації, зростає використання малих органічних молекул, таких як гормони, вітаміни та лікарські засоби з молекулярними масами зазвичай нижчими за 700 Да. Як правило, ці типи молекул потрібно іммобілізувати по-різному. Тип і кількість відповідних функціональних груп для зв'язування з поверхнею ЧЕ є унікальним для кожного типу молекул, і процедури загальної іммобілізації не застосовуються. В деяких випадках необхідно синтезувати похідні молекули зі специфічними функціональними групами. Це також може бути необхідним кроком для мінімізації труднощів при взаємодії між аналізованою речовиною і іммобілізованою молекулою. Крім того, часто органічні молекули мають дуже низьку розчинність у водних розчинах і повинні бути оброблені в органічних розчинниках, таких як ДМСО і ДМФ протягом іммобілізації.

Тому, отримання похідних молекул для збільшення розчинності в воді, є перспективним напрямком покращення умов іммобілізації. Електростатична взаємодія, як правило, в цьому випадку не застосовується.

Молекули з функціональними групами, такими як: аліфатичні аміни, меркаптани, альдегіди або карбоксильними групами, зазвичай можуть бути ковалентно пов'язані з відповідними комплементарними парами на поверхні ЧЕ. Амінне з'єднання зазвичай реалізується у водних буферних умовах при концентраціях між 1 і 50 мМ в розчинах з рН 7-8,5. З'єднання з тіолами ефективно в умовах нейтрального буферу, в той час конденсація альдегіду на гідрозид-модифікованій поверхні ЧЕ може бути виконана в слабкокислому буфері або в присутності відновлюючого агента, такого як ціаноборгідрид. Після їх активації до реактивних ефірів, молекули з карбоксильними групами можуть бути також іммобілізовані на поверхні ЧЕ з амінними або гідрозидними групами. Стадію активації можна виконувати або перед зв'язуванням, використовуючи EDC/NHS, або в присутності EDC безпосередньо під час реакції зв'язування.

Малі молекули без відповідних функціональних груп повинні бути модифіковані за процедурою, що зазвичай вимагає значних зусиль по синтезу специфічних органічних речовин. Цей підхід є кращим, оскільки іммобілізація молекулярної структури створює умови, необхідні для успішного завершення реакції взаємодії. Вибір типу функціональної групи і активного центру в молекулі необхідно оптимізувати, щоб уникнути інтерференції з іншими функціональними групами або частинами молекули. Також можна вводити спейсери для зниження підвищення розчинності в воді. Детальна інформація про різні підходи до модифікації поверхні ЧЕ узагальнена в роботах [40, 41]. Введення універсальних міток, таких як біотин також може бути застосовано до малих органічних молекул. Цей підхід є привабливим через комерційну доступність різних похідних біотину.

Карбогідрати

Вуглевімістні структури приймають участь у багатьох біологічних і імунних реакціях. Їх взаємодія з білками, як правило, вирізняється слабкою спорідненістю, і, тому, важко застосовувати традиційні методи аналізу. Тому, виявлення методом ППР доцільно використовувати для досліджень карбогідратів. Проте, іммобілізація вуглеводів є проблематичною і залежить від хімічної природи речовини.

Найчастіше використовують глюкозу для взаємодії з гідроксильними групами, зокрема сполуки глюкози з низькою вагою (наприклад, моно- до олігосахаридів), котрі важливі для підвищення активності зв'язування. Тому необхідно застосовувати альтернативні стратегії, аналогічні тим, які застосовуються для інших типів малих молекул. Найбільш поширеним підходом є використання аномерної альдегідної групи для безпосередньої іммобілізації, або для модифікації поверхні в розчині перед іммобілізацією. В таких випадках альтернативою є зв'язування за допомогою альдегідних груп та з реактивними групами, наприклад, тіолами, а також введенням похідних біотину [42, 43].

Полісахариди можуть бути іммобілізовані різними способами в залежності від присутніх на поверхні ЧЕ функціональних груп. Глікозилізовані білки можна розглядати як окремий випадок. Основна відмінність між "чистими" структурами полісахаридів і глікопротеїнами полягає в тому, що електростатична взаємодія не може застосовуватись. Для ковалентної іммобілізації через нуклеофільні або електрофільні групи (наприклад, реактивні аміни, альдегіди, або активовані карбоніли) повинні використовуватись високі концентрації полісахариду. Кращою альтернативою є функціональна група біотинілату іммобілізована на поверхню ЧЕ модифіковану стрептавідином, як показано на прикладі гепарину [44, 45].

ППР-сенсори знайшли застосування у багатьох галузях аналітичного приладобудування. Відповідно було розроблено великий діапазон способів

іммобілізації рецепторів та підготовки поверхні (модифікації) чутливих елементів. Вибір способу іммобілізації рецепторів залежить як від підготовки (модифікації) поверхні металевого шару чутливого елементу, так і від природи взаємодіючої пари рецептор-аналіт. Важливим чинником для вибору способу іммобілізації рецептору є кислотність середовища аналіту.

Таким чином, вибір методу функціоналізації поверхні суттєво залежить від фізико-хімічної природи взаємодіючих рецептора та аналіту і не може бути універсальним для всіх речовин.

РОЗДІЛ 7

ЗАСТОСУВАННЯ ПРИЛАДІВ НА ОСНОВІ ЯВИЩА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

7. 1. Контроль органічних речовин та неорганічних речовин в рідинах, мікробних патогенів та забруднення повітря парами розчинників

Контроль органічних речовин

Органічні речовини, які є небезпечними для навколишнього середовища, включають пестициди (які використовуються в сільському господарстві), поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ, побічний продукт неповного згоряння), поліхлоровані біфеніли (ПХБ, складові хладагентів і мастильних матеріалів), феноли (які використовуються у виробництві пластмас і пестицидів), діоксини (небажані побічні продукти багатьох промислових процесів, включаючи спалювання і хімічне виробництво фенолів, ПХБ гербіцидів) і алкідфеноли (поверхнево-активні речовин в агрохімікатах і побутових миючих засобах).

Пестициди

У сільському господарстві, кілька сотень різних пестицидів були використані в усьому світі протягом останніх декількох десятиліть. Завдяки їх широкому застосуванню і стійкості в навколишньому середовищі, пестициди накопичуються в носіях, таких як ґрунти і ґрунтові води. Багато пестицидів проявляють руйнуючу дію на ендокринну діяльність, яка створює загрозу для здоров'я населення і місцевих екосистем, і тому регулюється законодавством. У Європейському Союзі регулюються гранично допустимі концентрації декстранової хімії з тенденцією її зменшення.

За допомогою використання аналізу інгібування [1] можна виявити сімацін в діапазоні $0.11-1.1 \text{ ng mL}^{-1}$ протягом 20 хв. ППР-прилад для виявлення сімаціну показав можливість регенерації поверхні ЧЕ до 200 циклів виявлення без його заміни. Регенерацію проводили шляхом

послідовного інкубування в пепсині (2 mg mL^{-1}), розчині 50% ацетонітрилу і 1% пропіонової кислоти.

ЧЕ показав відносно високу перехресну реактивність з атразином і тетрабутиламонієвим атразином (приблизно 60%). Було виявлено сімацін в зразках природних поверхневих і підземних водах без підготовки проби крім фільтрації. Harris і ін. [2] поєднали цей ЧЕ з двома типами рецепторів антитіл (IgG і їх фрагментів Fab) для виявлення сімаціна та отримали калібрувальні характеристики для різних концентрацій цієї речовини (Рис. 7.1.).

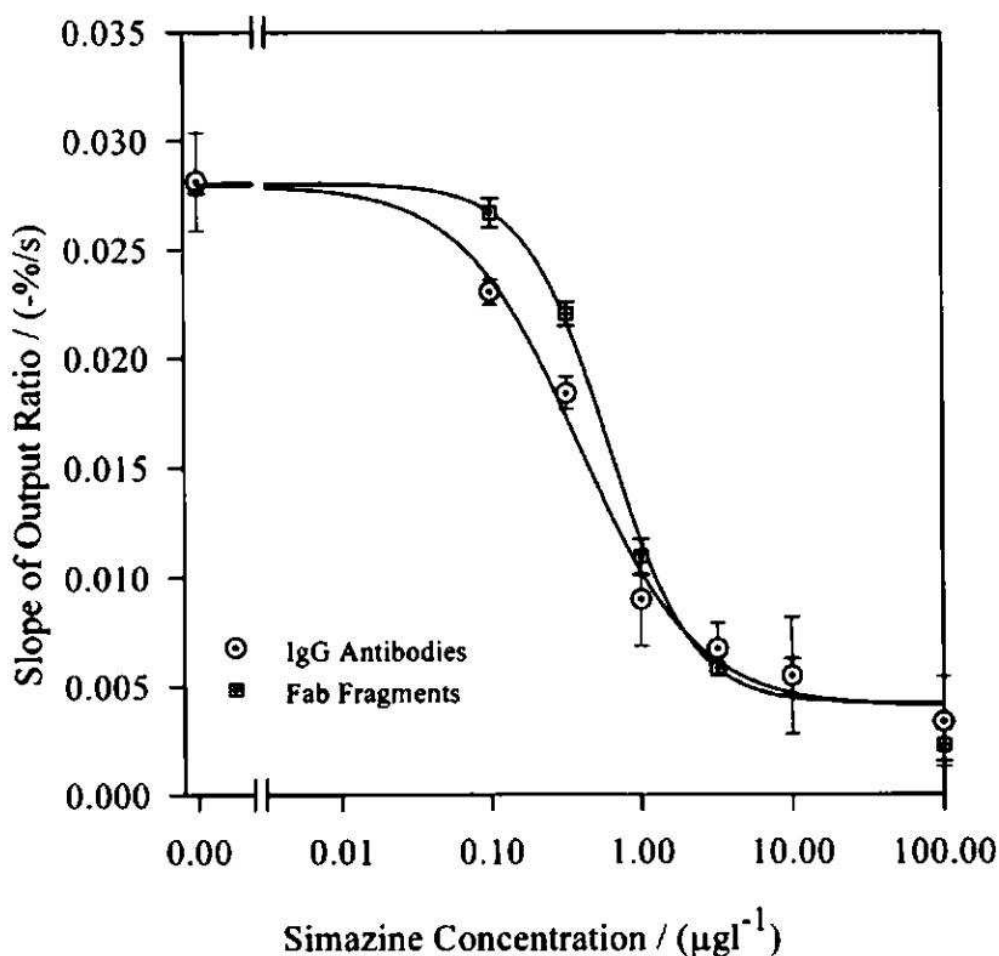


Рис. 7.1 Калібрувальна крива для виявлення сімаціна [2].

Gobi і співавт. [3] був виявлений ППР-імуносенсором пестицид 2-4 діхлорфеноксіуксусної кислоти (2,4-D), який широко використовується в сільському господарстві. Вони використовували аналіз інгібування і чутливий елемент, на якому були фізично обсорбовані суміш BSA і похідні

2,4-D білку. Дослідження проводили з використанням моноклональних антитіл в фосфатному буферному сольовому розчині (PBS) на комерційному приладі SPR-20 (від DKK-TOA, Японія). Було досягнуто діапазон виявлення від $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ до $1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ і час виявлення становив 20 хв. Регенерацію ЧЕ виявлення проводили пепсином ($10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) протягом 20 циклів.

Nakamura та ін. [4] продемонстрували пряме виявлення гербіцидів, використовуючі за рахунок реакції фотосинтезу (NHsRC) бактерій *Rhodobacter sphaeroides* (Рис. 7.2).

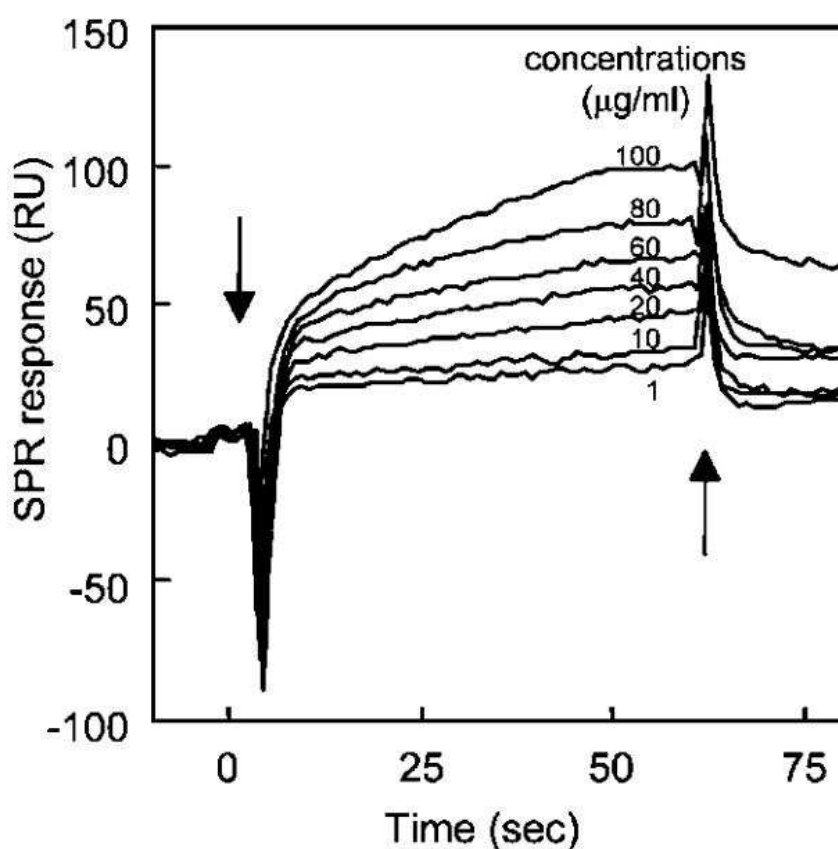


Рис. 7.2 Сенсограми, отримані для зв'язування атразину (з концентрацією 1-100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) для реакції фотосинтезу центру (HisRC) іммобілізованого на сенсорний чутливий елемент [4].

Дослідження виконували на приладі Biacore X (Biacore AB, Швеція) з чутливим елементом модифікованим декстрановою матрицею, в яку був іммобілізований NHsRC нікель - хелаторною хімією. Було продемонстровано

виявлення атразину в буфері в інтервалі концентрацій $1-100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Було досягнуто тривалості виявлення в межах кількох хвилин.

Chegel та інші [5] повідомили про ППР біосенсиори на основі з'єднання пластохінона з D1 білком, котрий взаємодіє з фотосинтез-пригніченими пестицидами. Вони використовували ППР біосенсор з кутовою модуляцією і білком D1, прикріпленим до ЧЕ фізичної адсорбції через моношар тіолу. Під впливом атразину, пластохінон від'єднувався від D1 білка, демонструючи зсув мінімуму характеристики відбиття при ППР. Цей біосенсор та методика іммобілізації рецептора на ЧЕ дозволили виявляти атразин в діапазоні концентрацій $50-5000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$.

В роботі Lim і ін. [6], виявлення атразину базується на основі специфічної взаємодії mRNA в бактеріях *Saccharomyces CEREVISIAE*, які зазнали впливу атразину. Клітини приводили в контакт з аналізованим зразком, виникав зсув характеристики ППР. Кількість mRNA вимірювалась за допомогою ППР біосенсора Biacore 2000 (Biacore AB, Швеція) з комплементарними олігонуклеотидними рецепторами, котрі були мічені біотином і іммобілізовані на поверхню ЧЕ з використанням стрептавідин-біотинової хімії. Надходило повідомлення про виявлення атразину в діапазоні від $1 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ до $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Тривалість аналізу виявлення mRNA, в тому числі з інкубацією бактерій, було виконано за 15 хвилин.

Ароматичні вуглеводні

Поліциклічні ароматичні вуглеводні (ПАВ) представляють собою групу з більш ніж 100 різних хімічних речовин, які утворюються при неповному згорянні вугілля, нафти, газу, сміття, або інших органічних речовин і можуть бути знайдені в повітрі, воді і ґрунті. Підвищена концентрація ПАВ в організмі людини викликає збої в роботі ендокринної системи та має канцерогенну активність. Стандартом США US EPA визначена максимально допустима концентрація бензо [a] пірену в питній воді в $0,2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [13]. Гобі, Міура та ін. [7-9] повідомили про ППР

иммуносенсор для виявлення бензо(а)пірену (БаП) і 2-гідроксібіфенілу (ГБФ, метаболіт БаП) за допомогою аналізу інгібування. Вони іммобілізували БаП і ГБФ до біачого сироваткового альбуміну (BSA) шляхом фізичної адсорбції на чутливий елемент двоканального ППР -приладу SPR-20 (DKK, Японія).

Використання моноклональних антитіл проти ВаР і НВР, дозволило одночасного виявляти БаП і ГБФ з межею виявлення $0,01 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [7]. Виявлення проводили протягом 15 хв, а ЧЕ був відновлений для повторних вимірів за допомогою пепсину і зміни рН. На ЧЕ було виявлено незначну відмінність чутливості між БаП і ГБФ (Рис. 7.3).

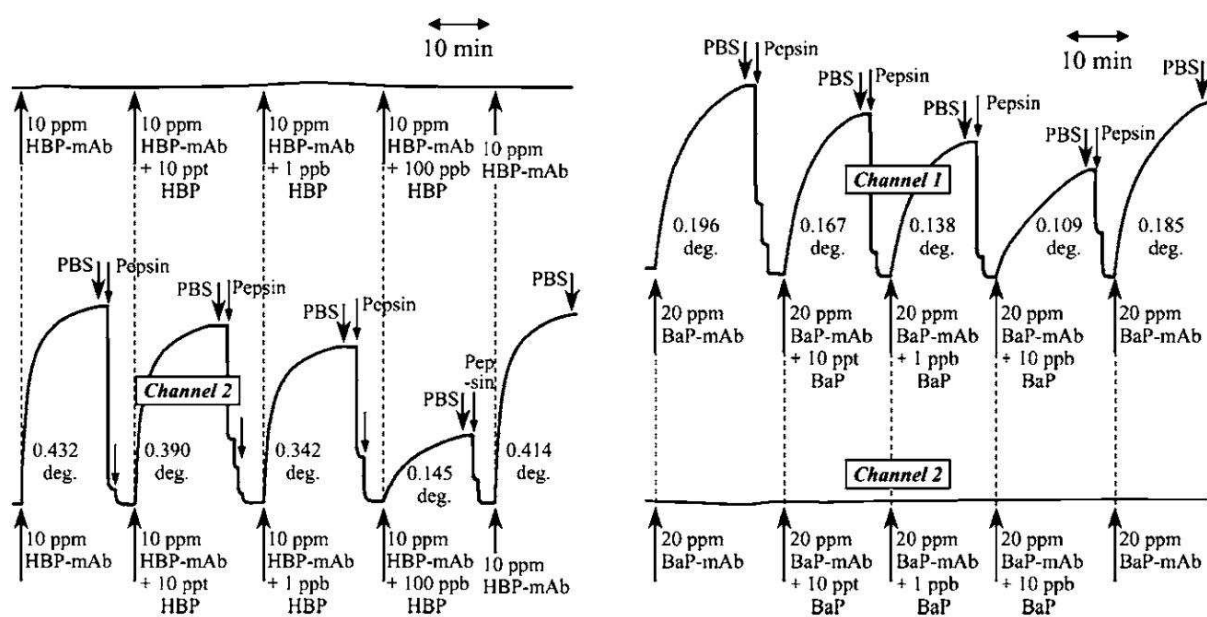


Рис. 7.3. Сенсограми отримані при різних концентраціях бенз(а)пірену (БаП), в 2-гідроксібіфенілі (ГБФ) [7].

Поліхлоровані біфеніли

Поліхлоровані біфеніли (PCB) - в даний час заборонені з'єднання - раніше використовувалися в гідравлічних рідинах, пластифікаторах, клеях, антипіренах і підсилювачах пестицидів. Ці шкідливі речовини зберігаються в навколишньому середовищі і присутні у відкладеннях на дні озер, річок і морів. Вони підлягають регулюванню, оскільки проявляють канцерогенну дію і руйнують ендокринну систему людини. Наприклад, в Сполучених Штатах, максимально допустима концентрація PCB в питній воді становить

0,5 ng·mL⁻¹ [13].

Shimomura та ін. [10] використовували ППР-сенсор приладу Biacore 2000 (Biacore AB, Швеція) для виявлення РСВ пентахлорбіфенілу. Вони використовували формат конкурентного аналізу і чутливий елемент з поліклональними антитілами, іммобілізованими в матриці декстрану. Зразок перемішували з кон'югатом РСВ пероксидази (HRP) і вводили у вимірювальну комірку приладу. Присутність аналіту була виявлена як наслідок зменшення зв'язування РСВ-HRP кон'югату. Вимірювання проводили протягом 15 хв, з межею виявлення 2.5 ng·mL⁻¹. Реакція показала можливість регенерації поверхні ЧЕ розчином 0,1М соляної кислоти.

Феноли

Фенольні сполуки, котрі шкодять навколишньому середовищу включають в себе бісфенол А, нонілфенол, 2,4-діхлорфенол, фенол, гідрохінон, резорцин, флороглюцин і катехін. Бісфенол А (BPA) являє собою з'єднання, гранично допустима концентрація якого на сьогодні не регулюється, але, він має слабкі естрогенні властивості, що порушує роботу ендокринної системи людини [11]. BPA широко використовується в якості пластифікатора при виробництві полікарбонату і епоксидних смол. Сіх і ін. розробили ППР імуносенсор, заснований на аналізі інгібування для виявлення BPA [34]. Вони використовували ППР-прилад SPR-20 (DKK, Японія) з чутливим елементом модифікованим тіоловим моношаром, на якому BPA був іммобілізованим через сукцінімідоловий ефір. Використання моноклонального антитіла дозволило виявити BPA при концентраціях нижче 10 ng·mL⁻¹. Тривалість виявлення становила приблизно 30 хв і регенерацію ЧЕ проводили 0,01 М розчином соляної кислоти.

Великі обсяги поліетоксільованих алкілфенолових миючих засобів потрапляють в навколишнє середовище, де відбувається їх розкладання, формуються більш токсичні і небезпечні сполуки, такі як алкіфеноли. Вміст алкілфенолів ще не регулюються, проте, наприклад, US EPA рекомендує

максимальну разову середню концентрацію (гострий критерій) і максимальну 4-денну середню концентрацію (хронічний критерій) 27,9 і 5,9 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$, відповідно, для нонілфенолу в прісних водах [12]. Нещодавно Самсонова та ін. повідомили про виявлення 4-нонілфенолу при аналізі інгібування [13]. Вони використовували пристрій Biacore Q (від Biacore AB, Швеція) і чутливий елемент модифікований декстрановою матрицею, на якій була іммобілізована 9-(p-гідроксифеніл) нонанована кислота. Використовуючи моноклональні антитіла, була досягнута межа виявлення 2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. Тривалість виявлення становила менше 3 хв. та включала стадію регенерації. ЧЕ регенерували розчином 100 мМ гідроксиду натрію в 10% -ному ацетонитрилі. Крім того, ЧЕ застосовували для виявлення 4-нонілфенол молюсків з межею виявлення 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Рис. 7.4) (тривалість підготовки проб складала приблизно 1 годину).

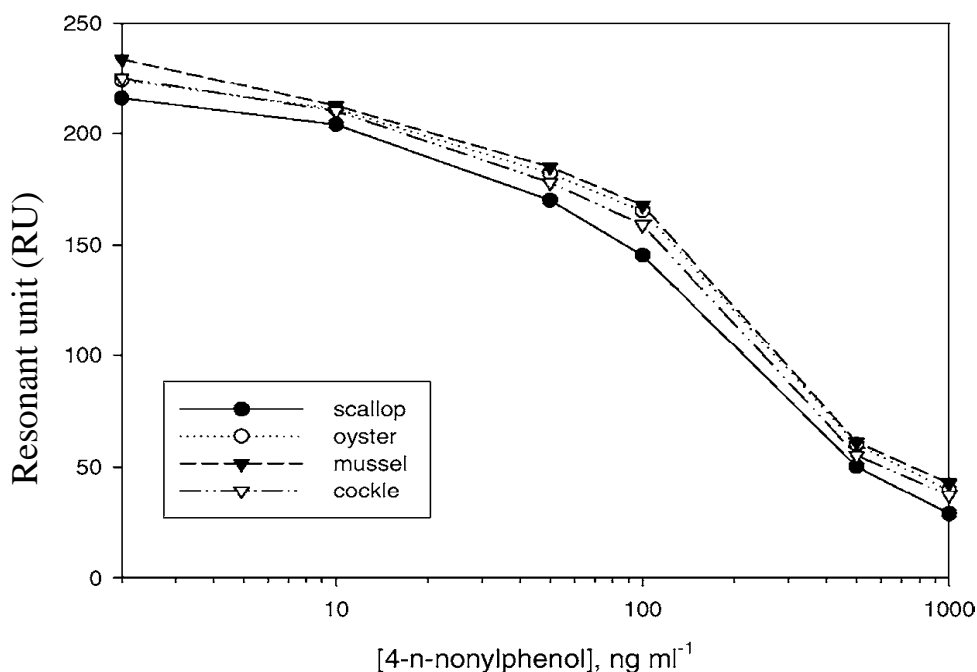


Рис. 7.4. Калібрувальна крива виявлення 4-нонілфенолу ППР-приладом в чотирьох різних зразках молюсків шляхом аналізу інгібування [13]

2,4-діхлорфенол є основним джерелом діоксину. В даний час він не регулюється, але входить в число забруднювачів питної води, які US EPA

планує регулювати в майбутньому [14]. Сіх і ін. розробили ППР біосенсор для виявлення цього з'єднання на основі конкурентного аналізу [15]. Вони використовували прилад SPR-20 (DKK, Японія) і чутливий елемент з моноклональними антитілами проти 2,4-діхлорфенола іммобілізованого на поверхню ЧЕ за допомогою пептиду і білка G. Аналіз був заснований на конкуренції між зв'язуванням з аналітом, присутнім в пробі і доданого кон'югату BSA-2,4-діхлорфенола. Межа виявлення 2,4-діхлорфенола становила $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Інші дослідження [16] продемонстрували пряме виявлення різних фенольних сполук (фенолу, гідрохінону, резорцину, флороглюцину і катехину) з використанням ППР приладу з модуляцією інтенсивності і синтетичних рецепторів абсорбованих в полімерному або золь-гельовому шарі ЧЕ.

Виявлення фенолів на основі вимірювання токсичності проводили Chio зі співавт. [17]. У своїх експериментах вони використовували прилад MultiScope-SPR (Optrel, Німеччина) і клітини кишкової палички, іммобілізованої на чутливий елемент через синтетичні цистеїн-кінцеві олігопептиди. Коли іммобілізовані клітини піддавали впливу фенолу, спостерігалось зменшення сигналу ППР-сенсору внаслідок пошкодження клітин. Використовуючи цей підхід, була виявлено фенол в концентраціях аж до $5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Діоксини

Діоксини потрапляють в навколишнє середовище через викиди при спалюванні побутових відходів, деяких хімічних відходів і з вихлопних газів автомобілів, що працюють на бензині. Діоксини є дуже стійкі і накопичуються в навколишньому середовищі. Вони мають високу токсичність і порушують ендокринну систему людини. В Сполучених Штатах для найбільш токсичних 2,3,7,8-TCDD діоксинів максимальна допустима концентрація в питній воді складає $10^{-4} \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ [18].

Шимомура та ін. розробили ППР біосенсор для виявлення 2,3,7,8-

TCDD [19]. Вони використовували прилад Biacore 2000 (Biacore AB, Швеція) і конкурентний аналіз з використанням моноклональних антитіл до 2,3,7,8-TCDD. Антитіло іммобілізували в декстрановій матриці чутливого елементу. Зразок перемішували з кон'югатом 2,3,7,8-TCDD – пероксидазою хрому (HRP) і вводили у вимірювальну кювету приладу. Аналіз був завершений за 15 хв. Межа детектування становила $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ та ЧЕ було регенеровано розчином $0,1 \text{ M}$ соляної кислоти.

Тринітротолуол

Існує потреба у швидкому виявленні вибухових речовин, особливо для відновлення навколишнього середовища та гуманітарного розмінування. Серед цих сполук, тринітротолуол (ТНТ) привернув велику увагу в якості основного компонента більшості протипіхотних мін та за його токсичними, мутагенними і канцерогенними ефектами.

Найкращі результати по виявленню ТНТ показав ППР-прилад SPREETA (від Texas Instruments, США) з одноразовим чутливий елементом, вкритим BSA-тринітробензолсульфоновим кон'югатом [20]. Виявлення тротилу було виконано шляхом аналізу інгібування при концентрації ТНТ до $1 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ для зразків ґрунту. Час, необхідний для підготовки проб (суспензії з наступним центрифугуванням) і аналізу досліджуваної рідини становив приблизно 10 і 6 хв, відповідно. Проводили регенерацію ЧЕ з використанням розчину $0,1 \text{ M}$ хлориду натрію і $0,1\%$ Тритон X-100.

Контроль неорганічних речовин

Важкі метали належать до групи шкідливих неорганічних забруднювачів. Вони потрапляють в навколишнє середовище від заводів і вугільних електростанцій і природньо не розкладаються в навколишньому середовищі [21]. В даний час вони регулюються і, наприклад, в прісноводних US EPA встановлює максимальні допустимі концентрації для важких металів, таких як кадмій (хронічний критерій $0,15 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [22]), мідь

(хронічний критерій $9 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [23]) , нікель (хронічний критерій $52 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [24]) і цинк (хронічний критерієм $120 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ [25]).

Виявлення важких металів було продемонстровано також в роботі [26], автори якої використовували прилад Biacore X (Biacore AB, Швеція. Металлотіонеїн є білок, який може бути знайдений в клітинах багатьох організмів і, як відомо, зв'язується з металами (зокрема кадмієм та цинком). Його іммобілізували на ЧЕ. Сучасні експерименти, в яких був використаний металлотіонеїн як рецептор, продемонстрували високий потенціал цього ЧЕ для безпосереднього виявлення Cd, Zn, і Ni в буфері при концентрації аж до $0,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

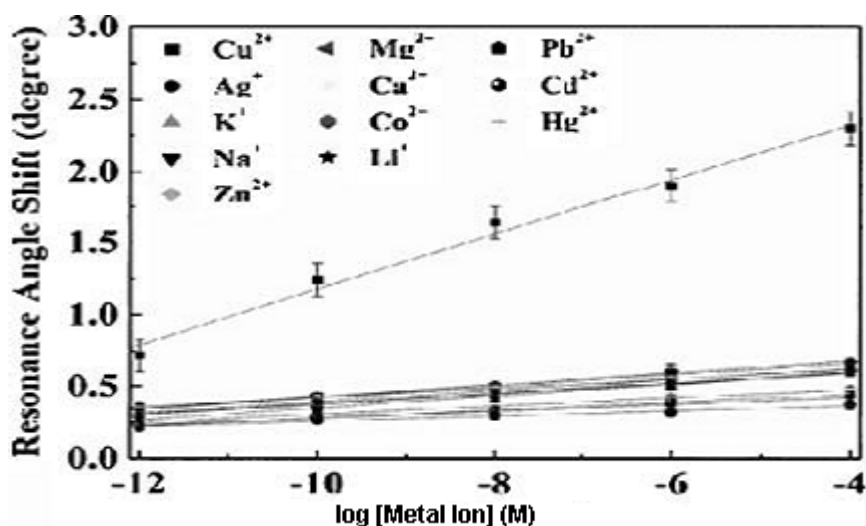


Рис. 7.5. Калібрувальна крива для виявлення Cu^{2+} ППР-приладом з SQ барвником, нанесеним на поверхню ЧЕ [26]

Барвник SQ змінює поглинання, коли він взаємодіє з вільними іонами Cu^{2+} . Завдяки аномальній дисперсії, котра супроводжує це поглинання, можна спостерігати розширення заломлення індексу змін, коли SQ барвник піддається дії Cu^{2+} іонів. Було показано, що налаштування робочої довжини хвилі ППР-приладу до довжини хвилі поглинання барвника, дозволяє селективно детектувати Cu^{2+} в діапазоні концентрацій від $1\cdot 10^{-12}$ - $1\cdot 10^{-4}$ М ($0,063 \text{ pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ до $6,3 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Рис. 7.5).

Контроль мікробних патогенів

Крім техногенних забруднень, існують інші шкідливі чинники, такі як бактеріальні патогени і токсини. Наприклад, бактеріальні патогени, включаючи легіонел, *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia* ентероколітні і кишкові палички O157: H7 можуть стати причиною спалаху епідемії шляхом потрапляння в систему подачі питної води. Ці бактерії становлять значну загрозу для населення, оскільки вони можуть викликати різні захворювання, такі як хвороба легіонерів (легіонел), гастроентерит (*Salmonella Typhimurium*) і діарея (*Yersinia* ентероколітні, кишкової палички O157: H7). Крім того, різні токсини можуть бути випущені в навколишнє середовище з природних джерел, таких як водорості. Серед них, домоева кислота (DA, токсин з низькою молекулярною масою, який отримують через морський діатом *Pseudonitzschia pungens*), яка представляє небезпеку для людських популяцій, так як може накопичуватися в їстівних молюсках і проявляє нейротоксичну дію.

Нещодавно, Oh і ін. розробили ППР іммуносенсор, здатний одночасного виявляти *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* та *Escherichia coli* ентероколітні і кишкові палички O157: H7 [27, 28]. Моноклональні антитіла проти цих бактерій були іммобілізовані в окремих каналах чутливого елементу приладу MultiScore-SPR (Optrel, Німеччина) іммобілізацією на білок G. Для бактерій в буфері була досягнута межа виявлення $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ і хорошу специфічність.

Lotierzo та ін. розробили ЧЕ ППР-приладу, отриманий молекулярною імпринт-літографією на базі полімерів для виявлення домоевої кислоти [29]. Вони використовували ЧЕ приладу Biacore 3000 (Biacore AB, Швеція) і метод конкурентного аналізу. Кон'югат пероксидази хрому і DA додавали в аналізований зразок і вимірювали конкуренцію зв'язування DA і кон'югату до чутливого елементу. Була досягнута межа виявлення $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ (Рис. 7.6). Нещодавно Yu. і співавторами виявлено DA за допомогою двоканального

датчика на основі порушеного повного відбиття і модуляції ППР [30]. DA був іммобілізований на чутливий елемент за допомогою тіольної хімії, і проводили аналіз інгібування за участю моноклонального антитіла. Було виявлено DA в таких низьких концентраціях, як $0,1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

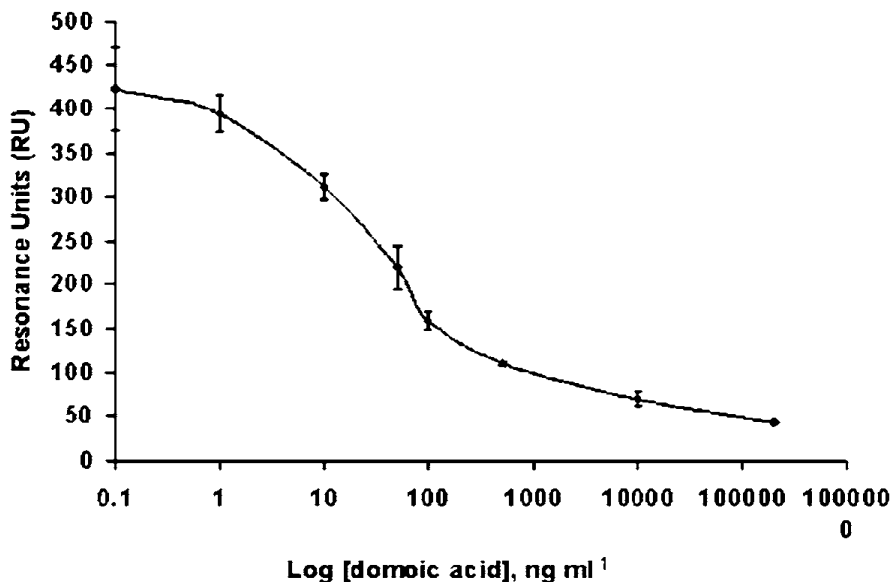


Рис. 7.6. Калібрувальна крива ППР-приладу молекулярною імпринт-літографією ЧЕ і конкурентним аналізом [30]

Датчик був регенований до 20 циклів виявлення з використанням розчину гідроксиду калію 50 мМ і продемонстрував здатність підтримувати свою активність навіть після двох місяців зберігання.

Контроль забруднення повітря

З розвитком промисловості росте кількість речовин, які забруднюють оточуюче середовище викидами підприємств, тому існує проблема контролю забруднення повітря шкідливими речовинами. Найбільш поширені методи контролю забруднення повітря наступні: теплові (термокондуктометричні, термохімічні, термосорбційні), магнітні (магнітомеханічні, магнітодефузійні, термомагнітні), оптичні (наприклад, інфрачервоний NDIR метод), люмінесцентний та хемілюмінесцентний, хроматографічні, телевізійні, електрохімічні [31]. Недоліком існуючих методів є потреба у великих

об'ємах досліджуваних проб та складність конструкції вимірювальних приладів.

Для оцінки рівня вмісту шкідливих речовин існує такий показник, як гранично допустима концентрація (ГДК), згідно якому безпечний рівень відповідає максимальній кількості шкідливої речовини в одиниці об'єму або маси, яка при щоденному впливі протягом необмеженого часу не викликає будь-яких змін в організмі людини [32].

Об'єктом дослідження був метанол, оскільки метанол має один із найнижчих рівнів ГДК, який, наприклад, в порівнянні із етанолом менше в 200 разів. Крім того, вдосконалений ЧЕ з додатковим шаром поруватого оксиду кремнію має найбільшу чутливість саме до метанолу. Метанол (метиловий спирт) [33] – безбарвна, прозора, легкозаймиста рідина з запахом, що нагадує етиловий спирт. Добре змішується з водою в будь-яких співвідношеннях. Являється розчинником для великої кількості органічних речовин. Застосовується для виготовлення карбамідних та іонообмінних смол, формальдегіду, оцтової кислоти, іметилтерефталату, метилметакрилату, пентаеритриту, синтетичного ізопренового каучуку; як розчинник у виробництві барвників та лакофарбних продуктів і для багатьох інших цілей.

Метанол є речовиною отруйною. Його дія спрямована на ураження нервової та судинної системи людини. Для метанолу гранично допустима концентрація становить 5 мг/м^3 [34]. До важкого отруєння може призвести навіть невелика кількість метанолу (до 5 мл), а в окремих випадках достатньо потрапляння 5-10 мл в організм людини, що призведе до сліпоти. Об'єм метанолу в кількості 30 мл призводить до смертельного випадку. Пари метанолу, потрапляючи в легені, надходять в перше коло кровообігу, минаючи печінковий бар'єр, який зазвичай затримує і знешкоджує отруту [35]. Тому є нагальна потреба в контролюванні не тільки рідкого стану, а й

випаровувань метанолу, адже в результаті він починає діяти значно швидше, ніж при потраплянні через шлунок.

Приладом «Плазмон-71» було виміряно концентрації метанолу в повітрі в режимі Multiple. Для дослідження сенсорної чутливості ППР-приладу до парів метанолу різної концентрації було застосовано ЧЕ з шаром золота товщиною 35 нм та з додатковим шаром пористого оксиду кремнію товщиною 140 нм. Дослідження сенсорної чутливості виконували шляхом почергового заміщення у вимірювальній кюветі кімнатного повітря повітряними сумішами метанолу з концентрацією метанолу від 0,05% об. до 40 % об. (Рис. 7.7). Для забезпечення потрібної концентрації насичену пару метанолу розбавляли сухим повітрям у m разів ($m = 2,5 \dots 2000$) за допомогою шприца ємністю 50 мл з матеріалу, інертного до досліджуваних речовин. Для зменшення похибки вимірювання відгуку ЧЕ ППР-сенсора на відповідні концентрації аналіту, викликані конденсацією та адсорбцією аналіту на стінках вимірювальної кювети, було виконано наступну модернізацію конструкції вимірювальної кювети, а саме:

- Замінено існуючу ущільнюючу прокладку з силікону товщиною 1 мм на нову з фторопласту-4 товщиною 100 мкм;
- Змінено матеріал конструкції кювети з поліметилметакрилату на фторопласт-4.

Внаслідок модернізації конструкції вимірювальної кювети її робочий об'єм було зменшено у 10 разів з 70 мкл до 7 мкл.

Послідовність етапів дослідження була наступною, а саме:

1. Вимірювали базову лінію для кімнатного повітря на протязі 7 хвилин;
2. Досліджувану пробу аналіту вводили протягом 2 хвилин і утримували в комірці протягом 3 хв без прокачування;
3. Виконували очищення вимірювальної комірки кімнатним повітрям прокачуючи його протягом 10 хвилин;

4. Виконували наступне послідовне заміщення аналіту кімнатним повітрям 8 разів для відповідних концентрацій метанолу;
5. Виконували завершальне очищення вимірювальної комірки кімнатним повітрям, прокачуючи його протягом 15 хвилин.

За результатами вимірювання було побудовано концентраційну залежність (Рис. 7.8).

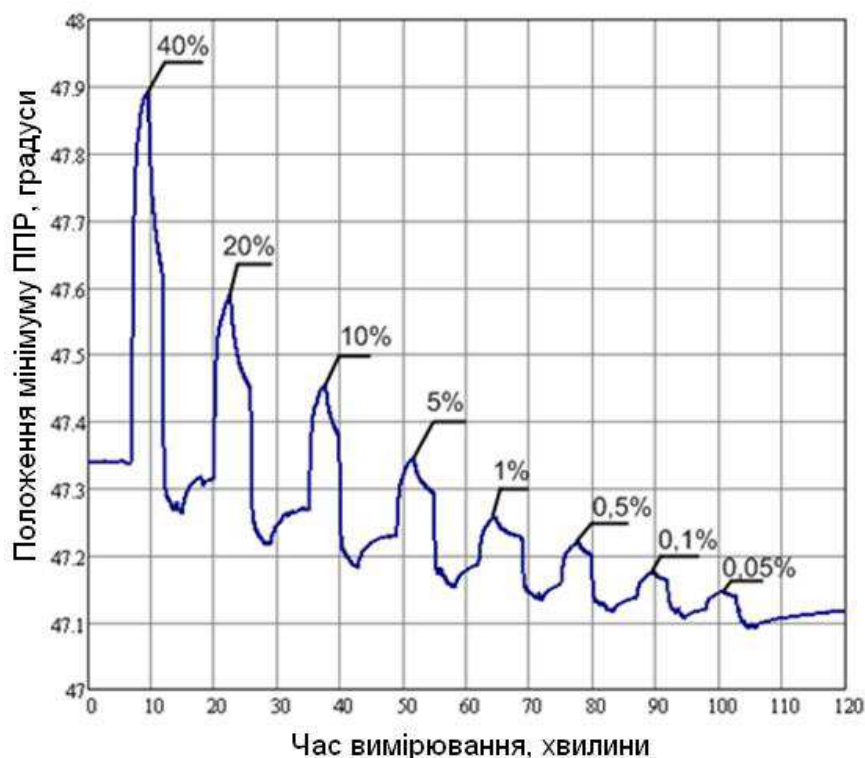


Рис. 7.7. Виміряна кінетика заміщення парів метанолу різної концентрації кімнатним повітрям [36].

Дрейф робочої точки за час вимірювання був наслідком впливу двох факторів: 1) поступовим охолодженням ЧЕ при прокачуванні аналіту; 2) циклічними змінами тиску в об'ємі вимірювальної кювети.

Аналіз концентраційної залежності дозволив виділити на ній дві ділянки:

- 1) Для концентрації метанола в повітрі від 0,05 %об. до 1% об. концентраційну залежність було апроксимовано лінійною залежністю зсуву

кута мінімуму кривої ППР від концентрації $\Delta\theta = 0,1068 \cdot C + 0,0568$, де C – концентрація метанолу в повітрі, а достовірність апроксимації $R^2 = 0,992$.

2) В діапазоні концентрацій метанолу в повітрі від 1%об. до 40%об. графік концентраційної залежності було апроксимовано також лінійною залежністю зсуву мінімуму кривої ППР від концентрації $\Delta\theta = 0,0128 \cdot C + 0,121$, де C – концентрація метанолу в повітрі, при цьому достовірність апроксимації складає $R^2 = 0,998$.

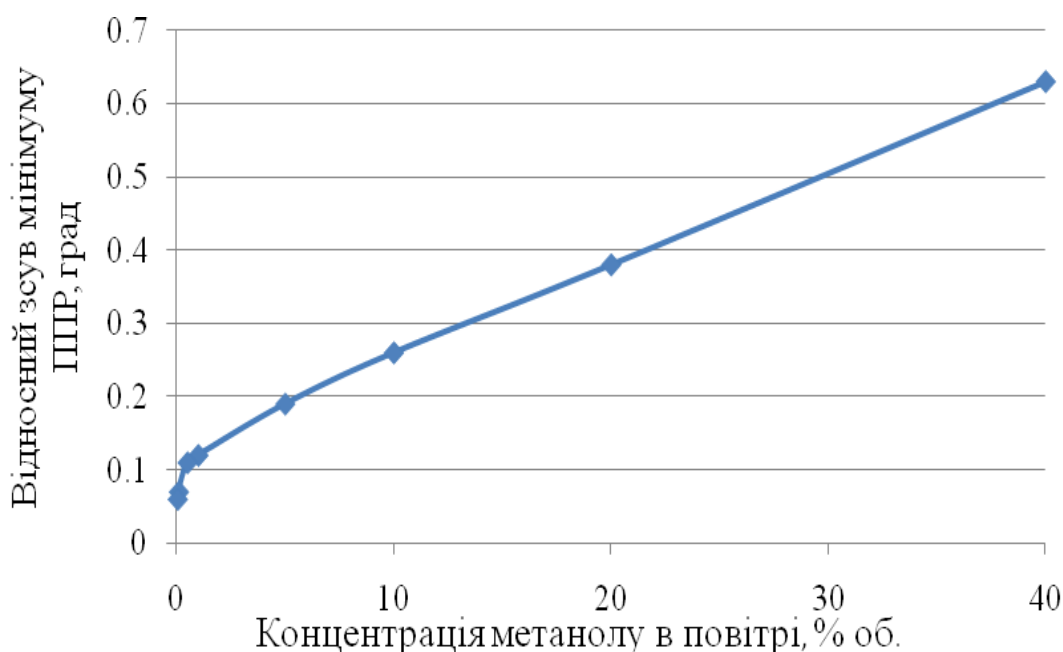


Рис. 7.8. Концентраційна залежність для парів метанолу [36].

Експериментальне дослідження показало, що прилад «Плазмон-71» з вдосконаленим ЧЕ забезпечує діапазон вимірювання концентрації метанолу в повітрі від 0,05%об. до 40%об. Проведені дослідження дозволяють рекомендувати метод ППР та прилад «Плазмон-71» для контролю концентрації парів метанолу в повітрі, гранично допустима концентрація якого складає приблизно 0,37% (5 мг/м³) [36].

7.2. Контроль продуктів харчування на наявність бактерій та токсинів

Бактерії

Бактерії - це категорія харчових патогенів, яка проявляється найчастіше в побуті. Через їх величезну різноманітність і надзвичайно низьку швидкість дифузії виявлення живих бактерій вкрай проблематичне. Щоб подолати це обмеження, використовуються різні методи виявлення бактерій. Знищення теплом призводить до морфологічних змін в структурі бактерій, які могли б поліпшити їх виявлення. Альтернативно, при використанні етанолу або детергенту для лізису клітин, створюються менші фрагменти, які можуть бути виявлені з більшою вірогідністю шляхом зменшення розміру продуктів лізису клітин, і, таким чином, збільшуючи швидкість дифузії аналіту до поверхні ЧЕ.

Escherichia Coli (E.coli) або Кишкова паличка O157: H7

Кишкова паличка - це бактерія, яка зазвичай мешкає в кишечнику всіх тварин. Хоча більшість штамів E.coli є доброякісними, існує кілька штамів E.coli, які здатні викликати хвороби людини. E. палички O157: H7 є одним з таких штамів E. палички O157: H7, котрі виробляють Vero токсини, які можуть призвести до серйозного пошкодження слизової оболонки кишечника. Недоварений або сирий м'ясний фарш був причиною в багатьох випадках захворювання людей. Найменша доза для інфікування штамом E.coli O157: H7 складає десять клітин.

Діагностика інфекції. Зазвичай це робиться шляхом виділення токсинів з кишкової палички O157: H7 або шляхом виділення самої бактерії із зразків калу людини. Підтвердження зараження отримується шляхом виділення серотипу від інкримінованого харчового зразка [37].

Прямі виявлення кишкової палички були розпочаті з 1998 року, коли Fratamico та ін. виявили життєздатні кишкові палички O157: H7, використовуючи прилад Biacore [38]. Вони порівнювали два чутливі елементи,

модифіковані N-етил-N'- (диметиламінопропіл) карбодіїмідами (EDC) через хімію N-гідроксисукциніміда (NHS). Моноклональні або поліклональні антитіла були пов'язані безпосередньо з чутливою поверхнею або були іммобілізовані на закріпленому шарі білка А чи білка G. Було продемонстровано використання сендвіч-аналізів, як показано на Рис. 7.9, нижня межа виявлення становила $(5-7) \cdot 10^7$ cfu/mL.

У 2002 році Ох та ін. використовували біосенсор Multiskop SPR для виявлення кишкової палички O157: H7 в таких низьких концентраціях, як 10^4 cells/mL [39]. Це було зроблено з використанням моноклональних антитіл (Mab), іммобілізованих на білковій G поверхні. Схожий метод дослідження використав Fratamico [38] (Рис. 7.9).

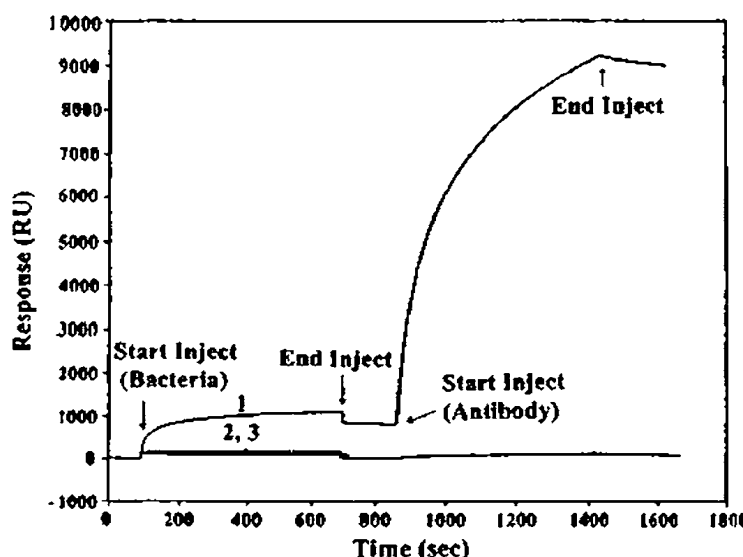


Рис. 7.9. Накладання ділянки сенсограмм показують взаємодію Mab 8-9H (ліганд) з кишковою паличкою O157: H7 (1), *S. Typhimurium* (2) і *Y. enterocolitica* (O3) з подальшим уприскуванням поліклональних антитіл на $50 \mu\text{g/mL}$ [38]

У 2003 році Ох та ін. використовували той самий ЧЕ, як і в їх попередньому дослідженні, але змінили чутливу поверхню, щоб оптимізувати змішаний SAM. Це знизило межу виявлення кишкової палички O157:H7 до 10^2 cells/mL з використанням того ж приладу [40]. В обох дослідженнях не було відзначено жодного методу діагностики та не було

модернізовано методику. У 2005 році Тейлор і ін. вивчали різні методи діагностики і їх вплив на виявлення кишкової палички O157: H7 з комерційного датчика [41]. У цьому дослідженні, Mab іммобілізували на чутливій поверхні через EDC/NHS і використали сендвіч-аналіз з поліклональних антитіл. Необроблені бактерії були виявлені на рівні досліджень Fratamico, 10^7 cfu/mL. Бактерії після термообробки та подальшого замочування в 70%-му етанолі показали межі 10^5 cfu/mL. Для лізисних бактерій з миючим засобом продемонстрували межу виявлення до 10^4 cfu/mL (Рис. 7.10).

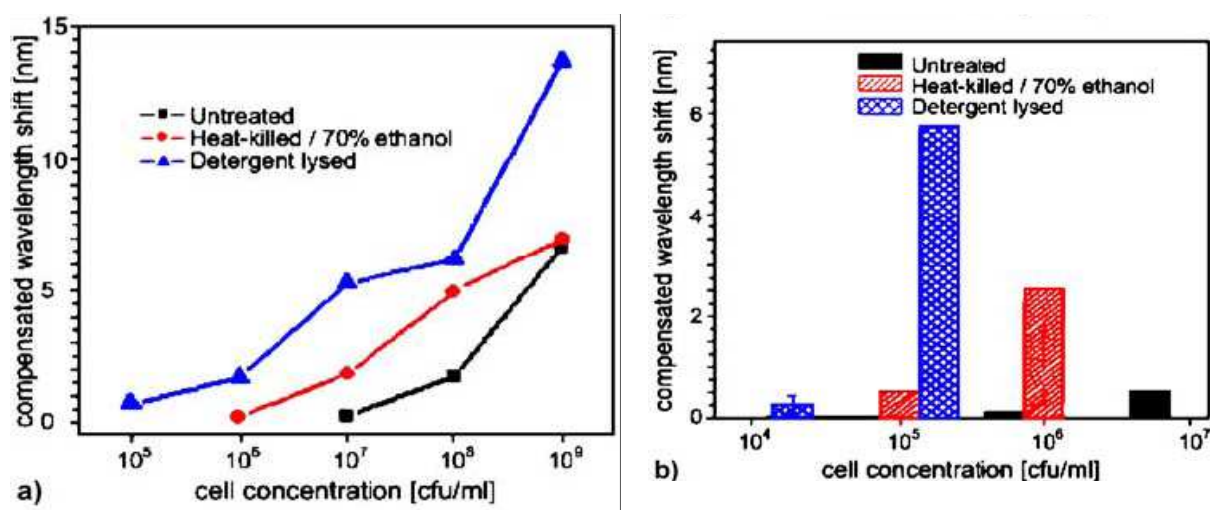


Рис. 7.10. Резонансне зрушення довжини хвилі в залежності від концентрації бактерій для виявлення кишкової палички O157: H7, порівнюючи необроблені, убитих нагріванням, потім етанолом замочені, та зразки миючого засобу для лізінгу шляхом прямого виявлення (а) і ампліфікації прямого виявлення (б) шляхом подальшої експозиції до МАb реактиву з кишкової палички O157: H7 (сендвіч-аналіз) [41]

Тейлор і ін. також досліджували неспецифічні взаємодії бактерій з чутливою поверхнею. Три неспецифічні, миючі-лізисні бактерії, E.coli K12, Salmonella Choleraesuis і лістерій, не показали неспецифічної адсорбції до чутливої поверхні при концентраціях 10^6 cfu/mL, 10^8 cfu/mL, and 10^7 cfu/mL відповідно.

Також було представлено непряме виявлення кишкової палички. У 1999 році Fratamico та ін. використовували аналіз інгібування для виявлення

кишкової палички O157: H7 [42]. Поліклональні антитіла до E.coli інкубували з життєздатними E.coli. Бактерії були отримані шляхом центрифугування.

Антитіло анти-Fab, котре іммобілізували на поверхні ЧЕ, було використане для захоплення вільного антитіла. Межі виявлення за допомогою аналізу інгібування становили 10^6 cfu/mL та 10^7 cfu/mL. Також у 1999 році Кай і ін. продемонстрували використання ППР-приладу для виявлення PCR-продуктів геному палички O157:H7 Escherichia [43]. Біотинілований послідовно ДНК-ЧЕ був іммобілізований на поверхні покритій стрептавідином. Для цього була приєднана до ЧЕ двухланцюгова ДНК-мішень. ДНК-мішень формувала поверхню ЧЕ. Про межі виявлення бактерій не повідомлялося.

У 2000 році Кай і ін. продемонстрували виявлення кишкової палички O157:H7 в зразках калу методом PCR [44]. Біотиніловані PCR іммобілізували на поверхнях покритих стрептавідином і використовували в якості зонда нитки. Е. палички O157: H7 був виявлений при 10^2 cfu/0.1 g зразка калу. Спенглер і ін. виявили кишкову паличку термолабільних ентеротоксин у 2001 [45]. У цьому дослідженні GM1 іммобілізували безпосередньо на поверхні золота. Ентеротоксин виявлено при концентраціях від 70 nM до 600 nM.

Сальмонела.

Сальмонела - це інфекційне бактерія, яку зазвичай можна знайти в сирому м'ясі, птиці, морепродуктах, а також яйцях, молоці і молочних продуктах. Інфекційна доза сальмонели може становити 15-20 клітин, в залежності від розміру і здоров'я людини. Діагностика інфекції зазвичай робиться шляхом виділення бактерій з зразків стулу.

У 2001 році Koubov та ін. продемонстрували виявлення сальмонел Enteritidis використанням ППР приладу [46]. Подвійний шар антитіл був

фізсорбований на поверхні золота і з'єднаний з глутаральдегідом. Використовуючи цю чутливу поверхню, були продемонстровані прямі виявлення убитих нагріванням, етанол просоченої *S. Enteritidis* в такій низькій кількості як 10^6 cells/mL. Bokken ін. було виявлено штам сальмонели з групи А, В, D, і Е, відповідно до типування Кауфман-White, використовуючи систему Biacore в 2003 році [47]. Антитіла були іммобілізовані на поверхні чутливого елементу з декстраном активованим EDC/NHS. Виявлення серотипів сальмонели вбитих теплом проводилися в сумішах без бактерій сальмонели, використовуючі сендвіч-аналізи. Сальмонела була виявлена при концентрації $1.7 \cdot 10^5$ cfu/mL. Ох та ін. досліджували *Salmonella Typhimurium* в 2004 [48] на базі конструкції білку G, котрий використовували в попередній роботі з кишковою паличкою O157: H7 [49]. Моноклональні антитіла до *S. Typhimurium* були іммобілізовані на поверхні білка G. Було показано детектування при концентраціях від 10^2 cfu/mL до 10^9 cfu/mL. Моноканальне тіло потім піддавали адсорбції на поверхні і використовували для виявлення. Виявлення *S. паратифів* було показано до концентрацій 10^2 cfu/mL.

Моноцитоген Лістерій

Лістерій був виділений з сирої риби, приготовленого крабу, сирих і варених креветок, сирого омару, сурімі і копченої риби. У той час як інфекційна доза *L. моноцитогенес* невідома, вважається, що вона менш ніж 1000 організмів. Сучасні технології діагностики лістеріозу включають культивування мікроорганізму з крові або спинно-мозкової рідини. Одночасно з їх вивченням *S. Enteritidis* в 2001 році, Koubov та ін. також дослідили моноцитогенес *L.* [46]. Використовуючи ЧЕ та подвійний шар фізично адсорбованих антитіл було визначено діапазон концентрацій від 10^7 cells/mL до 10^9 cells/mL. В даному дослідженні бактерії лістерія знищували за допомогою термічного впливу.

У 2004 році Леонард і ін. використовували інгібування, щоб виявити присутність цілих клітин моноцитогенес L. в розчині [50]. Комерційні козячі анти-кролячі поліклональні антитіла іммобілізували за допомогою EDC / NHS на модифікованій декстраном поверхні чутливого елементу ППР-приладу. Розчини відомих концентрацій L. моноцитогенес інкубували з кролячими антитілами анти-лістерій. Клітини і пов'язані антитіла потім центрифугували з розчину, і на поверхні ЧЕ були виявлені незв'язані антитіла, котрі залишилися в розчині. Використовуючи цей метод, були продемонстровано межу виявлення 10^5 cells/mL.

Campylobacter Jejuni

Campylobacter jejuni вважається провідною причиною бактеріальних діарейних захворювань в Сполучених Штатах. В той час як здорове населення в Сполучених Штатах чи Європі не є носіями цієї бактерії, *C. jejuni* був виділений від здорових корів і курей, а також в нехлорованих водних джерелах. Інфекційна доза вважається малою і становить лише 400-500 бактерій, котра може викликати хворобу. Типове діагностування кампілобактеріозу здійснюється шляхом виділення з зразків стулу людини. Тейлор і ін. продемонстрували виявлення *C. jejuni* [51]. Ці дослідження було зроблено в поєднанні з експериментами, що показали одночасне виявлення декількох бактерій, описаних нижче в цьому огляді. Діагностування проводили з використанням сендвіч-аналізу та антитіла, іммобілізованого за допомогою взаємодії біотину-стрептавідіну. Виявлення для вбитих нагріванням *C. jejuni* були показані для буферних розчинів, що містять тільки *C. jejuni*, а також сумішів *C. jejuni* і інших неспецифічних бактерій. Межі виявлення в обох випадках були встановлені при концентраціях $5 \cdot 10^4$ cfu/mL. Аналіз також було виконано у відповідній реальній комплексній матриці яблучного соку. Використовували яблучний сік з pH 3,7 та з pH 7,4.

Clostridium Perfringens

Clostridium Perfringens знаходиться в ґрунті, опадах і місцях, що піддаються впливу фекального забруднення людиною або твариною. Харчове отруєння *Perfringens* викликано прийомом великої кількості вироблених токсинів бактерією *C. Perfringens*. Інфекційна доза перевищує 10^8 вегетативних клітин. Діагноз отруєння *Perfringens* підтверджується шляхом діагностування токсину в калі хворих. Hsieh і ін. виділив бета-токсин, що виробляється *C.* в 1998 р. [52]. Моноклональні антитіла були іммобілізовані на декстрановій поверхні ЧЕ з використанням EDC/NHS. Дослідження показали, що робочий діапазон надійного детектування знаходиться в межах від 1/1,02 до 1/220 розведення.

Yersinia ентероколітна

Yersinia ентероколітна був виділена в ставках, озерах, м'ясі, морозиві і молоці. Типові симптоми ієрсиніозу включають гастроентерит, діарея, лихоманка і біль в животі. У той час як інфекційна доза невідома, діагноз ієрсиніозу робиться шляхом виділення з організму фекалій, крові, блювотних мас. У 2005 році Ох та ін. провели ряд досліджень з детектування *Y.* ентероколітних [53]. Моноклональні антитіла, іммобілізовані на поверхні білка G, аналогічні до тих, котрі використовували у своїх дослідженнях кишковим паличкам O157: H7 в 2001 році і *S. Typhimurium* в 2003. Було визначено діапазон діагностування з 10^2 cfu/mL до 10^7 cfu/mL.

Виявлення кількості бактерій

Велика частина роботи, яка була проведена з бактеріями протягом останніх кількох років, була зосереджена на поліпшенні меж детектування ППР-приладів. Це є важливим об'єктом досліджень, оскільки більшість з інфекційних доз харчових бактерій все ще нижче, або знаходяться в безпосередній близькості від існуючих порогів виявлення найбільш

чутливими приладами. Іншою важливою тенденцією розвитку сенсорних технологій є розширення кількості бактерій, котрі можуть бути одночасно визначені одним приладом. У 2005 Ох і ін. опублікував дослідження, яке показує виявлення окремих бактерій на чутливому елементі багатоканального ППР-приладу [54]. Використавши поверхню іммобілізованого G-білка, моноклональні антитіла чотирьох окремих бактерій (кишкової палички O157: H7, *S. Typhimurium*, *Listeria pneumophila*, *Y. enterocolitica*) іммобілізували на окремі канали ЧЕ. Кожен з чотирьох аналітів з відповідними бактеріями потім послідовно пропускали через кожний з чутливих каналів. Відгук ЧЕ становив 10^5 cfu/mL для кожної з бактерій, що показав хорошу специфічність (Рис. 7.11).

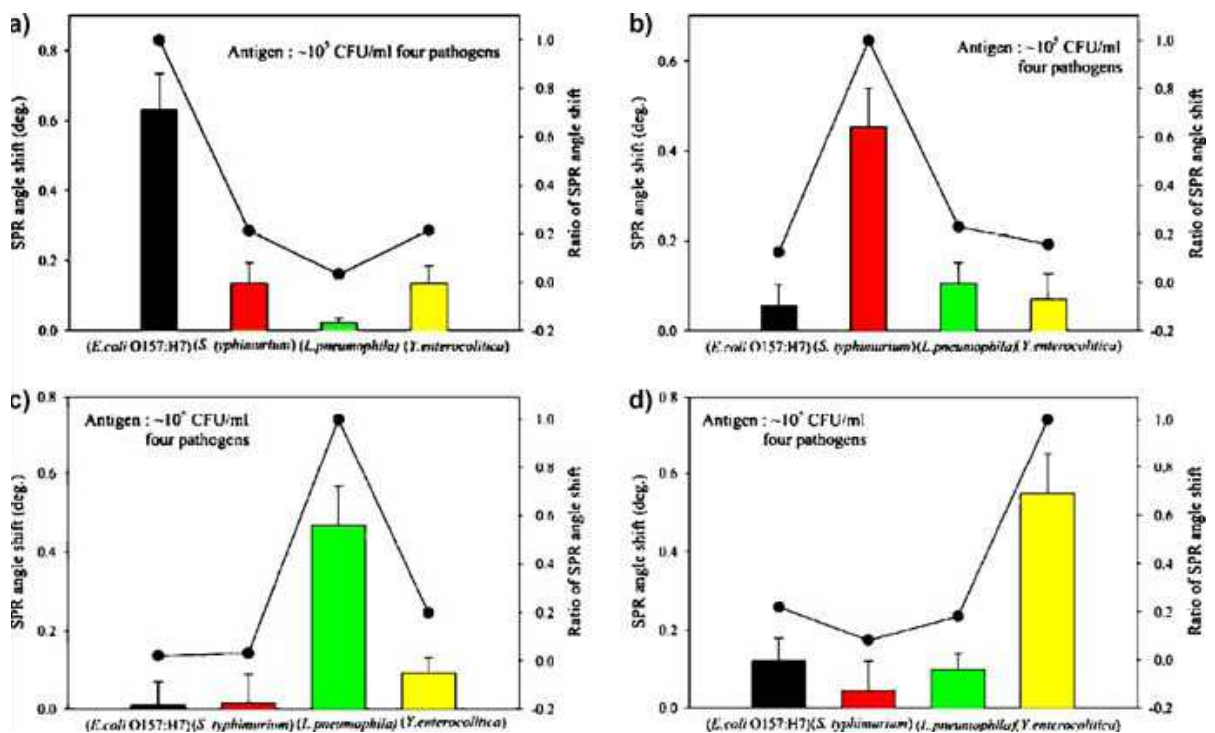


Рис. 7.11. Відповідь з чотирьох індивідуально функціоналізованих плям моноклональних антитіл на поверхні ЧЕ проти чотирьох збудників, котрі послідовно досліджувались з концентраціями 10^5 cfu/mL: а) Mab проти кишкової палички O157: H7; б) Mab проти *S. Typhimurium*; в) Mab проти *L. pneumophila*; і д) Mab проти *Y. enterocolitica*.

Тейлор та ін. продемонстрували одночасне виявлення чотирьох різних бактерій, кишкової палички O157: H7, *C. jejuni*, *S. Typhimurium* і *L. моноцитогенної* в буфері і яблучному соку [51]. Всі бактерії були убиті нагріванням і ультразвуком до ППР експерименту. Дослідження проводили на окремих бактеріях, а також в сумішах всіх чотирьох бактерій. Одночасне виявлення окремих бактерій в сумішах показали узгодження з визначенням окремих бактерій в буфері. Детектування окремих бактерій і їх сумішей були виконані також в яблучному соку на обох типах рН 3,7, а також з яблучним соком доводять до фізіологічного значення рН 7,4.

Відгук ЧЕ змінювався при регулюванні рН буферу, але це не впливало на досягнення нижньої межі детектування, яка у всіх чотирьох випадках становила при 10^4 cfu/mL, $5 \cdot 10^4$ cfu/mL, $5 \cdot 10^4$ cfu/mL, and 10^4 cfu/mL для кишкової палички O157: H7, *C. jejuni*, *S. Typhimurium*, і *L. моноцитогенес* відповідно.

Білкові структури та великомолекулярні токсини

Токсичні харчові білки виділяються з інфекційних бактерій. Такі білки зазвичай є токсичними в надзвичайно низьких дозах. Через невеликі молекулярні маси білків (від 5 кДа до 150 кДа), дифузії до поверхні не є проблематичними. Їх маса дозволяє сенсору реагувати на пряме зв'язування при більш високих концентраціях.

Стафілококовий ентеротоксин

Стафілококові ентеротоксини (SEs) є найбільш широко вивченим серед токсичних білків харчового походження. Хоча ці токсини виробляються різними штамами стафілокока, дані показали, що вони в основному виробляються штамом золотистого стафілокока. В даний час існує дев'ять ентеротоксинів (A, B, C, D, E, G, H, I, J), які були визначені в

найрізноманітніших харчових продуктах: м'ясі, птиці та яєчних продуктах, молоці і молочних продуктах, а також в хлібобулочних виробках [55]. Інфекційна доза токсинів оцінюється в $0.1 \mu\text{g/kg}$ маси тіла [56].

Nedelkov та ін. провели дослідження стафілококового ентеротоксину В (SEB) у 2000 році [57]. Антитіла до SEB іммобілізували на чутливій поверхні використанням EDC/NHS. Ця робота показала виявлення SEB в діапазоні концентрацій від 1 ng/mL до 100 ng/mL (Рис. 7.12).

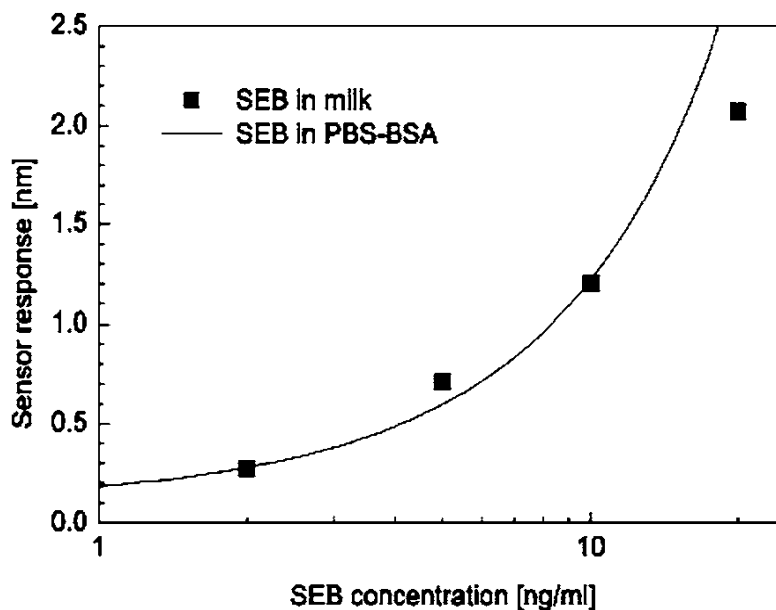


Рис. 7.12. Концентраційна залежність відгуку чутливого елементу ППР-приладу до стафілококового ентеротоксину В (SEB) в розчині BSA в фосфатно-сольовому буфері (BSA-PBS). Нормативний компенсований відгук рівноважного датчика до різних концентрацій SEB в розчині BSA -PBS для прямих і сендвіч режимів виявлення (A-SEB концентрації $3 \mu\text{g/mL}$ в BSA PBS) [58]

Стафілококовий ентеротоксин В діагностувався при концентраціях від 1 ng/mL до 100 ng/mL в матриці молока, а також в розчині екстракту гриба. У 2002 році Гомола та ін. показали поліпшення межі виявлення SEB [58]. Антитіла іммобілізували за допомогою EDC/NHS, що дозволило детектувати стафілокок в діапазоні концентрацій від 0.5 ng/mL до 50 ng/mL . Дослідження проводили безпосередньо за допомогою фізичної адсорбції на поверхню ЧЕ та ампліфікацією з вторинним антитілом. Було показано в молоці можливість виявлення стафілококів при концентрації навіть 0.5 ng/mL за допомогою

ампліфікації.

У 2002 році Наймушиным та ін. виявлено SEB шляхом використання індивідуального ЧЕ ППР-приладу [59]. Замість того, щоб використовувати EDC/NHS для зв'язування антитілом з SAM на поверхні ЧЕ, було використано EDC/NHS, щоб зв'язати антитіло до пептиду, іммобілізованого на поверхні золота.

Пряма реєстрація SEB спостерігалася при концентраціях в межах від 0,2 nM (~ 5.7 ng/mL) to 75 nM (2.1 μ g/mL) в буфері і концентрацією 0.5 nM (11.4 ng/mL) та 1 nM (22.8 ng/mL) в сечі і морській воді, відповідно. Використовуючи однокрокову ампліфікацію, були виявлені концентрації 50 pM (1.4 ng/mL) та 20 pM (0.6 ng/mL) в морській воді і буфері, відповідно. При двох стадій ампліфікації було досягнуто детектування концентрацій 100 fM (2.8 pg/mL) в буфері. Також в 2002 році Slavik та ін. провели дослідження з використанням оптико-волоконного датчика для виявлення SEB [60]. Двошарові антитіла були адсорбовані на поверхню п'ятиокису танталу і зшиті за допомогою глутаральдегіду з поверхнею ЧЕ. Детектували концентрації в діапазоні від 10 ng/mL до 100 ng/mL. Ампліфікація не використовувалась.

У 2003 році Nedelkov і Нельсон продемонстрували здатність модифікувати поверхню на одному ЧЕ [61]. Виявлення, Були зроблені дослідження концентрації в 1 ng/mL для трьох циклів регенерації чутливої поверхні та показали хорошу кореляцію. Медіни та ін. також досліджували SEB шляхом використання сендвіч-аналізу в 2003 [62]. SEB антитіло іммобілізували на поверхні ЧЕ, що дало можливість отримати межу детектування 2.5 ng/mL, що було продемонстровано в обох буферах і екстракті тканини шинки. Наймушин та ін. вивчали вплив температури на детектування SEB в озерній воді в 2003 [63]. В 2002 були показані прямі визначення концентрації в 2 nM (45.6 ng/mL). В роботі було також показано, що температура впливає на початкову швидкість зв'язування SEB. Максимальна швидкість зв'язування була зареєстрована при температурі

приблизно 45 °С. Медіна використовував аналіз інгібування для детектування SEB в 2005 році [64]. SEB був іммобілізований на поверхні ЧЕ, що дало можливість досліджувати концентрації в межах від 0.78 ng/mL до 50 ng/mL. Задані концентрації SEB потім інкубували з анти-SEB антитілами, причому інкубування розчину пройшло по всій чутливій поверхні. В цільному і в знежиреному молоці були знайдені SEB при концентраціях в межах від 0,312 ng/mL до 25 ng/mL.

Нейротоксини ботуліна

Нейротоксини ботуліна (BoNTs), мабуть, відомі як самі смертельні токсини. BoNTs представляють собою набір з семи серотипів (А, В, С, D, Е, F і G), які виробляються майже виключно бактеріями *Clostridium botulinum*. Серотипи С і D можна знайти у птахів і ссавців, крім людини. Типи А, В, Е і F були виявлені в людських випадках ботулізму. Половина гранично допустимої концентрація для BoNTs знаходиться в діапазоні від 1,1 до 2.5 ng/kg маси тіла людини [27]. BoNTs були пов'язані з різними продуктами, включаючи мед, чилі, і оладки. Виділення токсинів з підозрюваної їжі здійснюється за допомогою існуючих засобів діагностики.

Ледд ін. недавно продемонстрували одночасне виявлення трьох серотипів BoNT з використанням несерійного ППР-приладу. Виявлення серотипів А, В, і F були виконані за допомогою сендвіч-аналізу з поліклональних антитіл, іммобілізованих за допомогою взаємодії біотин-стрептавидину. Найнижчі концентрації, виявлені протягом серотипів А, В, і F в буфері становили 1 ng/mL, 1 ng/mL і 0,5 ng/mL, відповідно. Дослідження дозволили виявити нейротоксин в 20%-ому розчині меду.

Токсини з низькою молекулярною масою

Малі молекули створюють набагато більше проблем для ППР-приладів, ніж бактерії. У той час як швидкість дифузії у невеликих аналітів досить

велика, їх низькомолекулярна вага не викликає значного збільшення локального заломлення поблизу чутливої поверхні. Тому були розроблені різні стратегії, найбільш поширеними з яких є використання інгібованого або конкурентного аналізу.

Домоева кислота

Домоева кислота (DA) є нейрозбудником, токсин, який зазвичай отримують з планктонних водоростей. Молюски, особливо мідії, забруднюються DA, їжа з них містить водорості та токсини. Вживання в їжу забруднених молюсків людьми може викликати синдром інтоксикації, відомий як амнезія отруєння молюсками (ASP). Симптоми ASP включають блювоту і судоми, а також тимчасову або постійну втрату пам'яті [26].

У 2004 році Lotierzo та ін. дослідили наявність домоевої кислоти в продуктах харчування приладом Biacore 3000 [65]. Чутливий елемент складався з молекулярного відбитку полімерної плівки синтезованого імпринт-літографією. Межі виявлення домоевої кислоти становили від 2 ng/mL to 3.3 µg/mL. Поверхня була регенерована після кожного заміщення аналіту над ЧЕ і показала хорошу стабільність після 30-ти регенерацій.

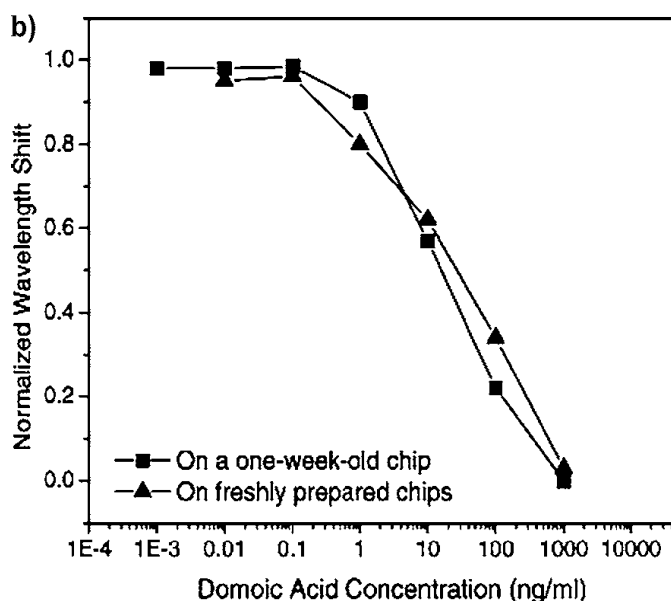


Рис. 7.13. Концентраційна залежність відгуку ППР для домоевої кислоти [66]

Yu. і ін. також досліджували можливість детектування домоевой кислоти, використовуючи ППР-прилад власного виробництва в 2005. DA іммобілізували на змішаній SAM (етиленгліколю) який містить алкантіюли (OEG), використовуючи EDC/NHS [66]. Змішаний SAM був розрахований для поліпшення властивостей сенсорного чутливого елементу. З використанням аналізу інгібування, DA був виявлений в діапазоні від 0.1 ng/mL до 1000 ng/mL.

Мікотоксини

Мікотоксини - низькомолекулярні метаболіти, вироблені з цвілі. Виробництво цих токсинів зазвичай асоціюється з бактеріальними видами *Aspergillus*, *Penicillium*, і *Fusarium*. Мікотоксини викликають несприятливі наслідки для здоров'я, починаючи від нудоти і запаморочення до канцерогенних і генотоксичних ефектів [26]. Три шкідливі види мікотоксинів, які найбільш часто зустрічаються, - мікотоксини фумонізинів, деоксініваленол і афлатоксини.

Фумонізени

Фумонізени B1 (FB1) є найбільш поширеним фумонізином в зараженій їжі і є найбільш токсичним для постраждалих тварин. Хоча різні побічні ефекти були відзначені в тваринництві, в даний час немає прямих доказів впливу фумонізинів на людину. Деякі непереконливі спостереження показують, що фумонізени можуть бути канцерогенними. Фумонізени пов'язані головним чином з кукурудзяними продуктами [26].

У 1998 році Mullett та ін. для детектування FB1 [67] використовували біосенсор, виготовлений за індивідуальним замовленням. Антитіло було адсорбоване до чутливої поверхні чистого золота. FB1 був виявлений безпосередньо при концентраціях в межах від 50 ng/mL до 100 µg/mL.

Дезоксиніваленол

Дезоксиніваленол найбільш часто знаходять на житі, рисі, пшениці та кукурудзі. Визначена допустима добова доза на рівні 0,5 $\mu\text{g/kg}$ маси тіла, що відповідає концентрації 100-500 мкг/кг в пшениці.

Trefgen та ін. використали прилад Biacore-Q для детектування деоксініваленола в зразках пшениці шляхом аналізу інгібування [68]. Дезоксиніваленол був кон'югований з казеїном і іммобілізований на чутливий елементі CM5 через EDC/NHS. Було показано можливість детектування концентрацій в межах від 0,05 ng/mL до 1000 ng/mL . Результати дослідження вологих і сухих зразків пшениці з природним забрудненням були аналогічні тим, що були отримані з використанням інших методів. Було також вивчено вплив часу інкубації зразка антитіла. Чои і ін. продемонстрували використання одноланцюгових варіабельних фрагментів антитіл для виявлення деоксініваленола в 2004 [69]. Кон'югат пероксидази деоксініваленол-гемі глутарат хрому іммобілізували на чутливий елементі CM5 з використанням амінного поєднання.

Афлатоксин

Афлатоксини представляють собою групу високотоксичних і канцерогенних речовин, вироблених певними штамми *Aspergillus Flavus* і *Aspergillus parasiticus*. Забруднення відбувається найчастіше в горіхах, арахісі та інших олійних культурах, включаючи кукурудзу. Найбільш токсичним і найпоширенішим з цих токсинів є афлатоксин В1. Половина гранично допустимої концентрації для афлатоксинів знаходиться в діапазоні від 0,5 до 10 мг / кг маси тіла. Діагноз зазвичай робиться шляхом виділення токсину з підозрюваної їжі.

Daly й ін. виявлено афлатоксина В1 з використанням аналізу інгібування на приладі Biacore у 2000 [70]. Афлатоксини В1 були кон'юговані

з БСА та іммобілізовані на поверхні декстрану з використанням EDC/NHS. Потім зразки афлатоксину інкубували і розміщували з антитілами в розчині. Цей розчин потім пропускали над поверхнею чутливого елементу. При інгібуванні прилад дозволяв визначати концентрацію афлатоксину від 3 ng/mL до 100 ng/mL.

Dunne та ін. показали в 2005 р. здатність виявляти афлатоксин B1, використовуючи фрагменти одноланцюгових антитіл (scFvs) [71]. Похідне афлатоксина B1 було іммобілізоване на чутливий елемент CM5. Афлатоксин B1 інкубували з мономерних або димеризованих scFvs, а потім розчин пропускали над чутливим елементом. Прилад детектував концентрації афлатоксину в діапазоні від 375 pg/mL до 12 ng/mL. Дімерні scFvs ППР-прилад дозволив виявити при концентрації від 190 pg/mL до 24 ng / mL. Поверхня чутливого елементу виявляла афлатоксин навіть після 75 циклів регенерації.

7.3. Застосування приладів для потреб фармакології та медицини

Діагностика онкозахворювань головного мозку.

Основним ефектом, що вимірюється, є зміна показника заломлення поблизу поверхні біосенсора внаслідок адсорбції біомолекул, або протіканні ферментної реакції. Відзначимо, що реєстрація показника заломлення прозорих біологічних середовищ – плазми крові, протоплазми, слини, сечі й ін. стає одним з рутинних аналітичних методів у біології, медицині й ветеринарії. У такий спосіб отримується додаткова інформація для діагностики захворювань.

Особливі труднощі для контролю представляють непрозорі (мутні) середовища або суміші мікрочастинок або клітин, куди можна віднести насамперед кров. Для контролю параметрів клітин крові традиційно використається розсіювання світла (лічильники кліток), спектри поглинання або відбиття, еридифрактометр. Іншим оптичним ефектом,

використовуваним для цієї мети, є спектри поглинання крові. Безліч робіт показує, що форма й кількість червоних кров'яних кліток відбивають стан організму в цілому, тому одержання відомостей про стан клітинного состава крові представляє цінну діагностичну інформацію.

Як зразки були використані плазма, гепаринізована кров здорових і хворих донорів, еритроцитарна маса, отримана після центрифугування й кров з добавкою цоликлонав. Кожен цикл вимірів був проведений не менш, ніж триразово. Для всіх зразків крові проведений незалежний вимір швидкості осідання еритроцитів (СОЕ).

Досліджували групи хворих з гліомами головного мозку різного ступеня злоякісності, що проходили курс комплексного лікування, включаючи хірургічне втручання, в Інституті нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова АМН України. Дослідження проводили до початку лікування (60 хв.) та через 7 діб після видалення внутрішньомозкових пухлин (48 хв.)

Гепаринізовану венозну кров, взятую у хворих на гліоми різного ступеня злоякісності, розділяли шляхом центрифугування на клітинну фракцію і плазму. Клітинну фракцію використовували для визначення показників ППР. В якості контролю аналогічний забір крові проводили у здорових людей (10 чол.), що пройшли клінічне обстеження перед здачею крові у пункті переливання крові при Інституті нейрохірургії. В якості групи порівняння використовували показники, отримані у хворих на черепно-мозкову травму (ЧМТ) середнього ступеня важкості (10 чол.) і з метастазами раку (Mt) в головний мозок (14 чол.). Клітинну щільність гліом різного ступеня злоякісності визначали, проводячи морфологічну обробку біопсій тканин мозку та пухлин за допомогою системи аналізу зображень IBAS - 2000 фірми KONTRON (Germany) при збільшенні світового мікроскопа в 200 разів. Вимірювали по 30 відстаней між ядрами клітин (в мікрометрах) при різних ступенях злоякісності гліом (збільшення мікроскопа в 100 разів) [72].

Розміри гліом визначали за допомогою ЯМР-томографа “SOMATOM CR” фірми Siemens (Germany), використовуючи показники діаметра та об’єму гліом (в см). Виявили, що величина відгуку чутливого елементу ППР-приладу залежить від стану здоров’я організму. На Рисунку. 7.14. представлені нормовані статистичні дані, отримані в Київському Інституті нейрохірургії протягом 1,5 років. Всього зроблено більше 400 вимірів, які оброблені стандартними статистичними методами. Легко бачити, що ППР відгук, по суті нормована величина Δf_{min} закономірно зменшується в ряду «здоровий – 1-я – 2-я – 3-я міра злоякісності гліоми – ЧМТ»

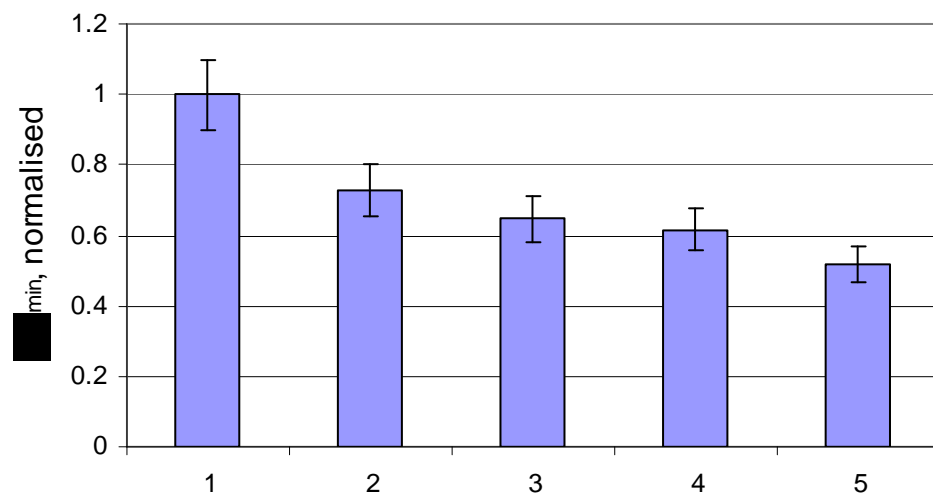


Рис. 7.14. Показники ППР для 1 – здорова людина, 2 – гліома I ступеню, 3 – гліома II ступеню, 4 – гліома III ступеню, 5 – черепно-мозкова травма [72].

Дуже важливо підкреслити, що зміни показників ППР периферичної крові проходять закономірно, корелюючи зі ступенем злоякісності гліом, при цьому мінімальні показники фіксуються у пацієнтів з гліомами високого ступеня злоякісності. Зменшення показників ППР у процесі прогресії гліом відзначено нами також у хворих з продовженим ростом пухлин, які були госпіталізовані в клініку для проведення повторних операцій.

Результати проведених досліджень показали, що рівень змін показників ППР периферичної крові може корелювати з клітинною щільністю гліом, відображаючи ступінь злоякісності цих пухлин. Показано, що зміни

показників ППР клітин крові у піддослідних пацієнтів можуть бути одним із факторів прогнозування швидкості прогресії гліом в післяопераційному періоді, що дозволить своєчасно використати превентивні методи по відношенню до появи рецидивів гліом. Стратегія таких методів повинна бути направлена на підвищення трансмембранного потенціалу клітин крові з метою зменшення рівня їх міграції в ложе видаленої пухлини. На основі зіставлень в змінах показників ППР в клітинах крові та їх взаємозв'язку зі змінами щільності клітин паренхіматозних органів появляються нові можливості в проведенні корегуючих впливів на ріст пухлини, що включають, наряду з традиційними методами хіміотерапії, позитивну протизапальну терапію [72-74].

Противухлинні наноформи рослинних фенолів.

В роботі [75] представлена оцінка ефективності лікувальних впливів щодо гальмування проліферації пухлинних клітин та індукції в них апоптозу на основі даних про зміст білків фактора транскрипції NF-κB і продуктів залежних від нього генів в екстрактах пухлин тварин, що піддавалися лікувальним впливам.

Для вивчення взаємозв'язку між метаболізмом поліамінів і активністю фактора транскрипції NF-κB дослідження проводили в умовах деплеції/аккумуляції у тварин поліамінів. Ці дослідження проведено на щурах з перещепленими пухлинами молочної залози (карциносаркомою Уокер). Для створення стану виснаження (деплеції) поліамінів в пухлинах тваринам вводили α-дифторметилорнітин (α-ДФМО) – специфічний і необоротний інгібітор орнітиндекарбоксилази (ОДК), яка є ключовим ферментом біосинтезу путресцину, з якого далі синтезуються спермідин та спермін. Цю речовину щурам вводили в двох різних дозах : 500 мг/кг та 1000 мг/кг, 2-5 разів після появи пухлин. Вміст p50- та p65-субодиниць фактору NF-κB та вміст білків онкогенів c-myc та Bcl-XL в ядерних, цитоплазматичних і клітинних екстрактах оцінювали за допомогою методу поверхневого плазмонного резонансу (ППР) та імуноблотингу. Вміст поліамінів в ядерних,

цитоплазматичних та клітинних екстрактах і гомогенатах пухлин визначали за допомогою методів тонкошарової хроматографії та вискоефективної рідинної хроматографії високого тиску. Паралельно імуногістохімічним методом досліджували зміни вмісту та внутрішньоклітинної локалізації (цитоплазматичної, перинуклеарної або ядерної) ОДК в пухлинах щурів.

Проведені дослідження дозволили визначити, що споживання тваринами рослинних поліфенолів призводить до зменшення експресії в ядрах пухлинних клітин фактора NF-κB (білків p50 і p65) і зниження в пухлинах експресії білків, продуктів NF-κB-залежних генів (c-myc, bcl-xl, inos, cox-2). У той же час, експресія інгібіторного білка NF-κB (IκBα) і білка p53 в пухлинних клітинах підвищувалася. Показано, що рослинні поліфеноли підсилюють протипухлинний ефект цисплатина, доксорубіцину і синтетичних інгібіторів синтезу ПА (полігексаметиленгуанідину, ПМГ і α-діфторметілорнітін,ДФМО). Ці досліді показали, що метод ППР, особливо при використанні багатоканального ППР-приладу ефективний і зручний для визначення експресії білкових факторів сигнальної трансдукції. Отримуваним методом результати добре корелюють з тими, що спостерігались *in vivo* біологічними ефектами.

Визначення антитіл до вірусів та бактерій

Зараз важливою світовою проблемою є експресний контроль розповсюдження ретровірусної інфекції серед людей та тварин. Як відомо, ретровіруси є збудниками набутого імунодефіциту у людей, що відомий як захворювання на СНІД; вони є також збудниками вірусного лейкозу великої рогатої худоби. Слід зазначити, що це захворювання може передаватись від тварини до людини через вживання молока. Особливо це небезпечно для осіб чоловічої статі. Що стосується інфекційного лейкозу, то основним заходом для його подолання є постійна діагностика гурта тварин, відбраковка хворих осіб та їх знищення. Лейкоз – це пухлинне захворювання гемолімфопоетичної системи, характеризується злоякісним розростанням

кровотворних тканин, порушенням процесу визрівання кровотворних клітин з переважно інтенсивним утворенням молодих клітинних форм. Лейкозом хворіють всі види ссавців, птахи, риби, особливо поширений лейкоз великої рогатої худоби, зареєстрований на всіх континентах в десятках країн. Лейкоз проявляється у двох формах: власне лейкоз та ретикульоз. Особливістю захворювання є довготривалий перебіг без помітних порушень у стані здоров'я. Профілактика та ліквідація лейкозу ускладнено в зв'язку з надзвичайним поширенням захворювання. Основною причиною неблагополуччя господарств з лейкозу є введення в здорове стадо неперевіраних на лейкоз тварин. Тому удосконалення методів діагностики, які б дозволили виявити захворювання на початкових стадіях розвитку – вкрай важлива і невідкладна задача. Зважаючи на це, особлива увага приділяється засобам діагностики.

Розроблено біля 20 різних методів лабораторної діагностики лейкозу: гематологічні, гістологічні, а також імунологічні методи, основані на визначенні наявності індукованих вірусом антитіл у сироватці крові тварин. Для встановлення онковірусної інфекції у тварин узаконено реакцію імунодифузії (РІД). Цей метод простий і дешевий, має певні недоліки, пов'язані перш за все з низькою чутливістю та великими витратами часу для виконання аналізу. Останнім часом спостерігається тенденція застосування в практиці іmunферментного аналізу (прилади типу ELISA). Іmunферментний аналіз відрізняється високою специфічністю та чутливістю, але кошовність такого аналізу не дозволяє поки що впровадити його в широку ветеринарну практику. Тому однією з важливих задач на сьогодні є розробка нових чутливих та специфічних, але водночас простих і швидких методів для діагностики лейкозу на ранніх етапах розвитку захворювання.

Для реалізації експресних методів контролю вірусних захворювань у ветеринарній медицині був розроблений портативний біосенсор на основі ефекту ППР. Біосенсор є автономним, тобто може працювати без допомоги

комп'ютера. Робота біосенсора керується мікропроцесором за допомогою спеціально розробленого програмного забезпечення. Результати вимірювання виводяться на знакоцифровий дисплей. Це дозволяє застосовувати біосенсор в польових умовах.

Розроблений біосенсор на було перевіряно для детектування лейкозу великої рогатої худоби [76, 77].

Антиген вірусу лейкозу був отриманий від підприємства “Лейкопол” м. Полтава. Надсадкову рідину з культури клітин FLK, яка містить вірус центрифугували та обробляли тритоном X 100. Концентрований вірусний антиген використовується для імунологічних досліджень в РІД. Для використання антигену в сенсорному імуноаналізі було необхідне додаткове очищення антигену за допомогою ультрафільтрації та адсорбції на пористому склі з діаметром пор 100 нм. В експерименті використовували 10-кратне розведення антигену в дистильованій воді.

Сироватки крові корів отримано з різних господарств Полтавської області. Всі сироватки були перевірені в РІД в і умовно розділені на три групи: РІД-позитивні, РІД-негативні та сумнівні, тобто сироватки, що не утворювали в РІД чіткої лінії преципітації в гелі. Для дослідження на ППР готували розведення сироваток у 0.05 М фосфатному буфері рН 7,4, що містив 0.14 М хлористого натрію (PBS). 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну (Sigma) готували, використовуючи PBS.

Сироватки крові імунізованих корів також отримано з господарств Полтавської області. Для імунізації використовували вакцину ВЛ, розроблену “Лейкопол”.

Спочатку реєстрували резонансний кут при введенні в вимірювальну комірку (об'ємом 40 мкл) дистильованої води. Потім в неї вносили розчин антигену вірусу лейкозу, витримували його там 20 хв. при кімнатній температурі, промивали комірку дистильованою водою для видалення надлишку антигену, що не сорбувався на поверхні та реєстрували зсув

резонансного кута. Для запобігання неспецифічного зв'язування компонентів сироватки на поверхні трансд'юсера в комірку вносили 1% розчин БСА і витримували 10 хв. при кімнатній температурі, після чого промивали фосфатним буфером (PBS) і реєстрували покази приладу. Потім комірку наповнювали розчином антисироватки, послідовно зменшуючи кратність розведення: 1:20000, 1:10000, 1:1000, 1:500. Час інкубації для кожної проби був 10 хв. Комірку кожного разу промивали PBS для видалення елементів, що не зв'язалися і після цього реєстрували відгук імунного сенсора.

В експерименті використано препарат антигену вірусу лейкозу різного ступеню очистки, сироватки від корів, визначених в РІД як РІД-позитивні, РІД-негативні та сумнівні, а також сироватки крові імунізованих корів.

Спочатку була перевірена можливість використання в імуносенсорному аналізі на основі ППР препарату антигену вірусу лейкозу (ВЛ), що серійно випускається підприємством “Лейкопол” для досліджень в РІД. 10-кратне розведення препарату іммобілізували на золотій поверхні спонтанною сорбцією, реєстрували зсув резонансного кута в межах 4500-6000 сек. Потім додавали специфічну антисироватку в розведеннях 1:10000 та 1:1000 і реєстрували відгук сенсора (Рисунок 7.15.), який корелював з концентрацією антитіл у пробі.

Таким чином, було з'ясовано, що очищений зазначеним способом препарат антигену ВЛ дозволяє визначити рівень специфічних антитіл у сироватці крові вже в 10000-кратному її розведенні. Слід зауважити, що паралельно антиген був перевірений в РІД, де він утворював з відповідною антисироваткою чітку лінію преципітації в гелі.

Утворення на поверхні сенсору комплексу АГ-АТ супроводжувалось зміною резонансного кута. Зсув кута мав зворотну залежність від кратності розведення сироваток, тобто відгук сенсора пропорційний кількості специфічних антитіл у пробі (Рисунок 7.16.).

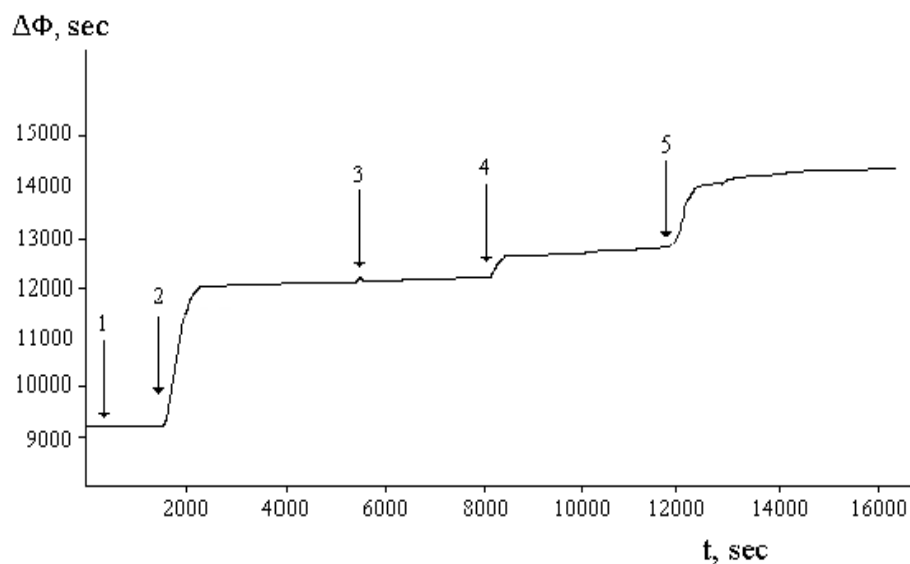


Рис. 7.15. Відгук сенсора на внесення біологічних компонентів у вимірювальну комірку. 1 – 5 - дистильована вода, антиген, БСА та анти сироватки з розведеннями 1: 10000 та 1:1000, відповідно [76].

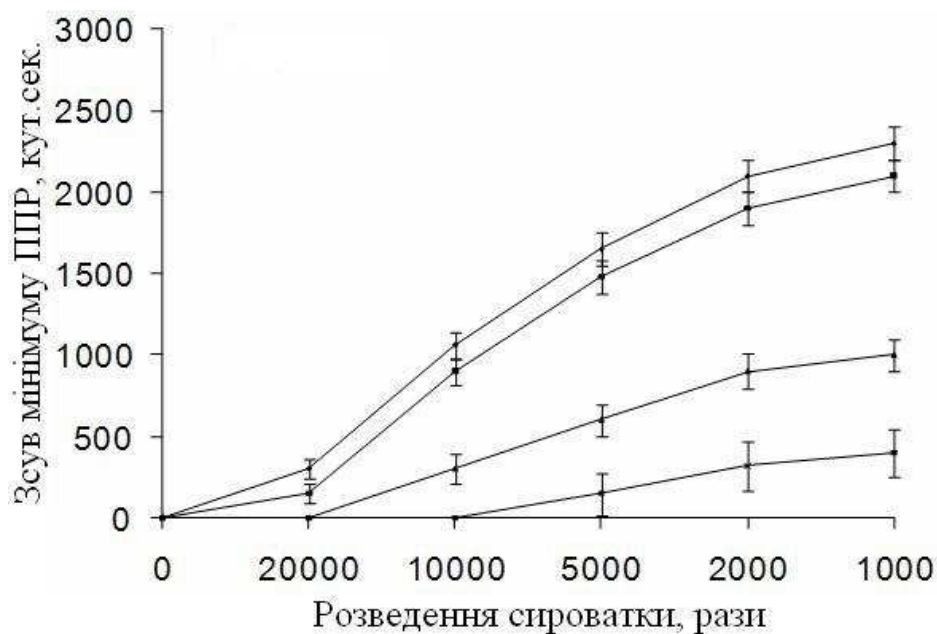


Рис. 7.16. Залежність відхилення резонансного кута імунного сенсора (зсув мінімуму ППР) на основі ППР при дослідженні сироваток корів з різною інтенсивністю РІД. 1 – 4 - РІД(++), РІД(-, +), РІД(+), РІД(-), відповідно [76].

В якості контролю було обрано проби сироваток ВРХ з господарств, благополучних по лейкозу, тобто таких, де не було зареєстровано жодного

випадку захворювання тварин на лейкоз. В таких сироватках також не виявлено специфічних антитіл в аналізі за допомогою імунного сенсора на основі ППР (Рисунок 7.17.). Лише в розведеннях 1:300 реєстрували зсув резонансного кута в межах 200 сек., і це пов'язано з тим, що при таких малих розведеннях може відбуватись неспецифічне зв'язування компонентів сироватки на поверхні. Було перевірено сироватки крові корів, які пройшли імунізацію, титр антитіл в таких пробах становив 1:20000 (Рисунок 7.18.).

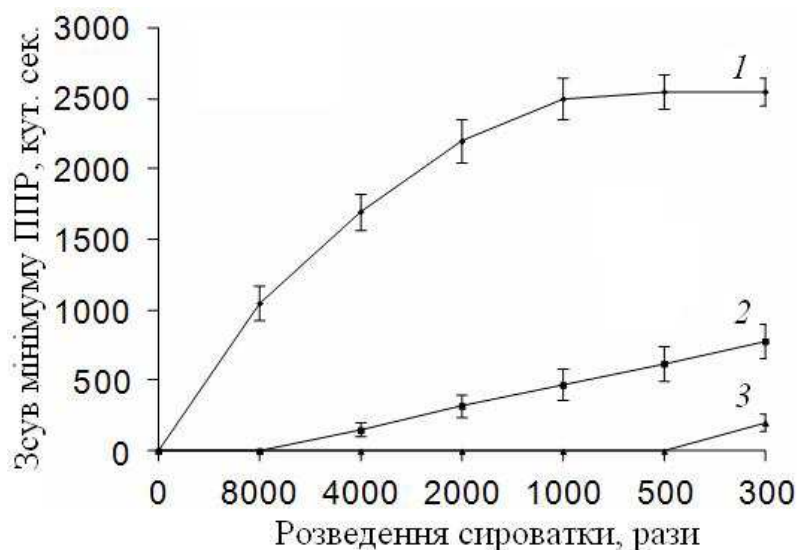


Рис. 7.17. Залежність відхилення резонансного кута імунного сенсора (зсув мінімуму ППР) при дослідженні сироваток різних груп корів. 1 – 3 - РІД-позитивні, РІД-негативні та здорові корови, відповідно [76].

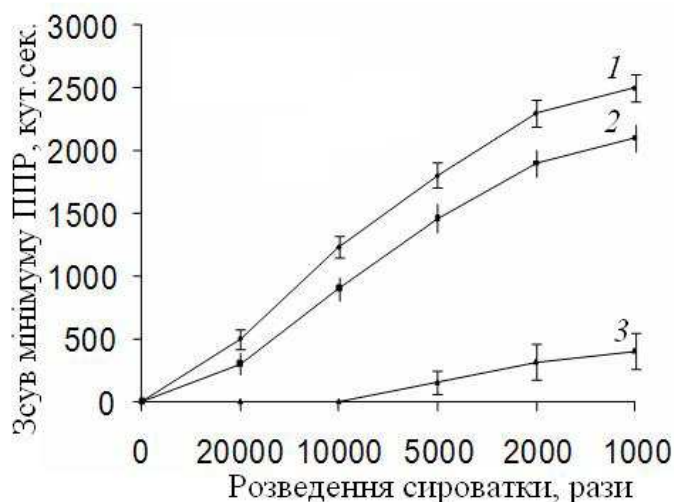


Рис. 7.18. Залежність резонансного кута імунного сенсора при дослідженні сироваток РІД-позитивних та вакцинованих корів. 1 – 3 - сироватки вакцинованих, РІД-позитивних; та РІД-негативних корів, відповідно [76].

В результаті перевірки розробленого портативного біосенсору на основі ефекту ППР для реалізації експресних методів контролю вірусних захворювань у ветеринарній медицині в якості імунного сенсору для детектування лейкозу великої рогатої худоби можна зробити слідує висновки:

- Імуносенсорний аналіз на основі ППР є чутливим, швидким та зручним методом діагностики лейкозу ВРХ, який базується на визначенні рівня антитіл, індукованих вірусом лейкозу, у сироватці крові тварин.

- Основними антигенними маркерами ВЛ є білки gp51 та p24. Препарат, випускається серійно і широко застосовується для скрінінгових досліджень в РІД, але потребує додаткової очистки для використання в імуносенсорному аналізі. Імобілізація очищеного антигену ВЛ дозволяє визначати рівень специфічних антитіл в сироватці крові хворих та вакцинованих тварин.

- Оптимальною кратністю розведення для сироваток при експресному визначенні специфічних антитіл на ППР встановлено 1:500.

Однак дана робота була лише початком досліджень в галузі застосування імуносенсорного аналізу для діагностики лейкозу. Слід за цим, поставало багато питань, які потребували окремого детального вивчення. До таких питань, наприклад, належить диференціація антитіл, індукованих польовим ВЛ та вакцинним препаратом ВЛ. Також важливою проблемою є діагностування лейкозу не по крові ВРХ, а по дослідженням молока.

Серологічна діагностика має велике практичне значення для здійснення первинного скрінінгу лейкозу великої рогатої худоби. Процес розвитку серологічних методів тісно пов'язаний з розробкою імуносенсорів, які дозволяють зробити аналіз таким, як цього вимагає практика, а саме, чутливим, специфічним, швидким та дешевим. Важливою перевагою імуносенсорного аналізу є те, що його можна проводити в режимі реального часу і в польових умовах, безпосередньо на фермах.

Антиген вірусу лейкозу отримано від НВ ТОВ “Лейкопол” м. Полтава. Надосадову рідину з культури клітин FLK, яка містила вірус, центрифугували та обробляли тритоном X 100. Концентрований вірусний антиген використовується для імунологічних досліджень в реакції імунодифузії (РІД). Для проведення сенсорного імунного аналізу отриманий вище зазначеним способом антиген додатково очищали від клітинних білків за допомогою ультрафільтрації та адсорбції на твердих носіях, що є предметом патентної заявки. В експерименті використовували розчин отриманого антигену в концентрації 2 мг/мл в дистильованій воді.

Сироватки крові та молока корів були взяті в різних господарствах Полтавської області. Всі сироватки крові попередньо були перевірені в РІД. Титр специфічних антитіл в РІД-позитивних сироватках крові становив 1:128-1:256. Свіже молоко розводили 5% оцтовою кислотою, центрифугували протягом 15 хвилин при 400 g, одержували сироватку. Для дослідження імунним сенсором на основі ППР готували різні розведення сироваток у 0,01 М фосфатному буфері з рН 7,4, що містив 0,14 М хлористого натрію (ЗФР). 1% розчин бичачого сироваткового альбуміну (БСА), отриманого з Sigma, готували, використовуючи ЗФР.

Тестування сироваток на наявність в них антитіл, специфічних до білків gp51 та p24 ретровірусу проводили наступним чином. Спочатку реєстрували резонансний кут при введенні в вимірювальну комірку (об'ємом 10 мкл) буферного розчину. Потім комірку наповнювали розчином специфічного антигену, витримували його там 20 хвилин при кімнатній температурі, промивали комірку ЗФР для видалення надлишку антигену, і реєстрували покази приладу. Далі в комірку вводили розчин сироватки молока в розведення: 1:10; 1:20; 1:40; 1:80 1:160 та 1:320. Час інкубації для кожної проби був 10 хвилин. Кожного разу комірку промивали буфером, що містив 0,05 % твін-20 в ЗФР, для видалення елементів, що не зв'язалися і після цього реєстрували відгук імунного сенсора.

Доведено, що фізична сорбція антигену на поверхні перетворювача є стабільною в часі і не руйнується при промиванні вимірювальної комірки буфером. Імобілізація антигену супроводжується зміною резонансного кута в межах 4000-4500 кут.с. Після обробки поверхні розчином БСА суттєвих змін кута не відмічалось. Це означає, що кількість вільних місць зв'язування було мінімальним, а концентрація антигену - оптимальною для створення щільного шару. Потім в вимірювальну комірку додавали сироватки молока від РІД-позитивних корів в діапазоні розведень 1:10 – 1:320. Утворення на поверхні сенсора імунного комплексу зумовлювало появу специфічного сигналу.

В експерименті досліджено 15 проб від РІД-позитивних та 10 проб від РІД-негативних корів (Рис. 7.19.)

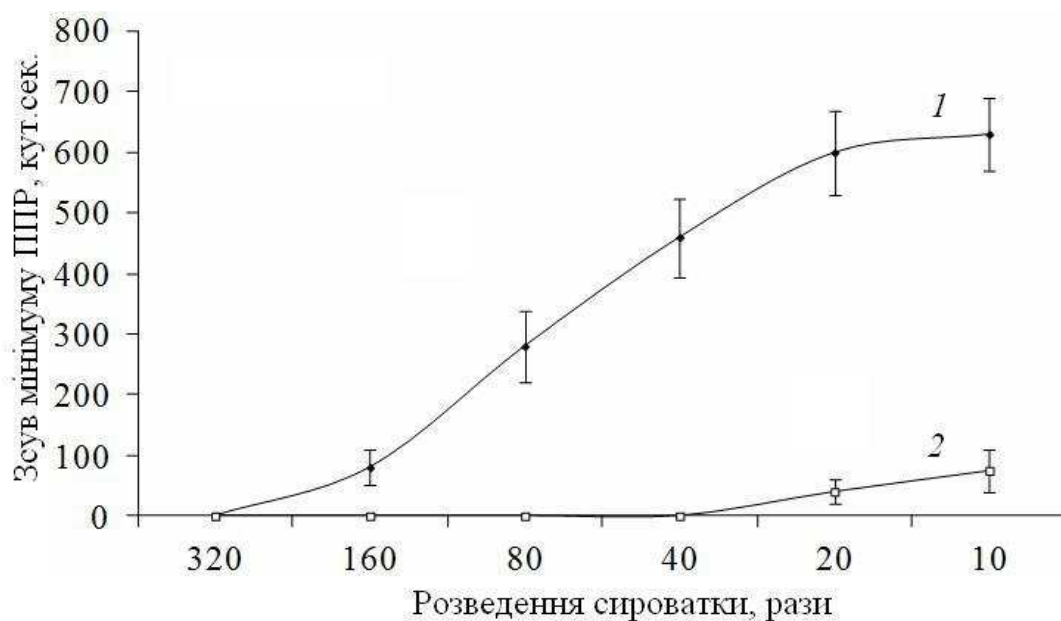


Рис. 7.19. Залежність відхилення резонансного кута імунного сенсора на основі ППР при дослідженні сироваток молока корів РІД-позитивних (1) та РІД-негативних (2) корів. По осі абсцис – розведення сироватки, по осі ординат - зміна резонансного кута [76].

На Рис. 7.19 представлені середні значення отриманих даних. Встановлено, що при дослідженні проб молока від хворих тварин імуносенсорний аналіз дозволяє реєструвати наявність антитіл при 80-кратних розведеннях сироватки і при цьому вдавалось фіксувати зсув кута в

межах 250 - 300 кут. с. Оптимальним для проведення такого аналізу було розведення 1:20. При такому розведенні контрольні проби не викликали зміни резонансного кута. Проте проби молока від РІД-негативних корів спричиняв відгук в межах 50 - 70 кут. с. Це пов'язано з тим, що антитіла присутні в таких сироватках в кількостях, що лежать за межами чутливості РІД, тобто, ці проби насправді не є лейкоз-негативні.

Крім того, було досліджено 12 проб сироваток крові і молока від РІД-позитивних та 10 проб від РІД-негативних корів. В експерименті використовували розведення сироваток крові 1:500 (мінімальне розведення для сироваток крові), та розведення сироваток молока 1:20. Показано, що сироватки крові РІД-позитивних корів зумовлювали зсув резонансного кута в межах 1500 - 1600 кут. с, а їхні сироватки молока - 600 - 650 кут. с (Рисунок. 7.20.).

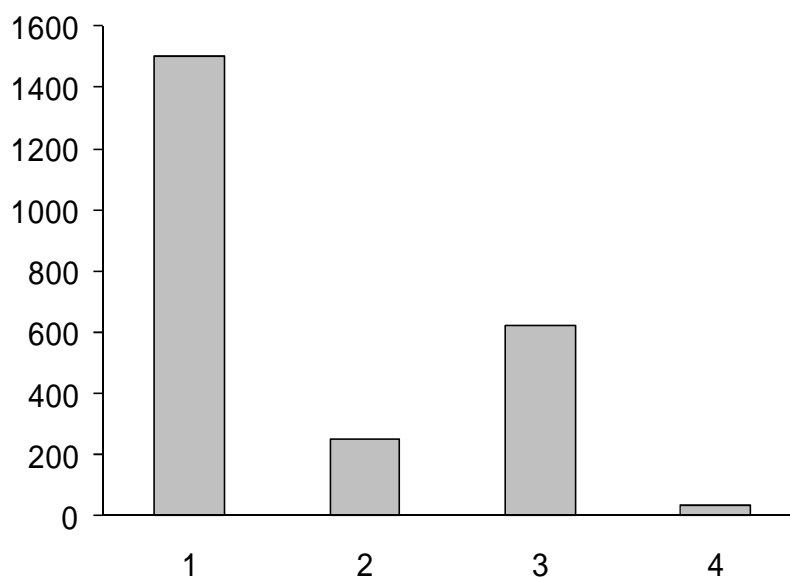


Рис. 7.20. Величини відхилення резонансного кута імуноного сенсора на основі ППР при дослідженні сироваток крові та молока корів. 1, 2 – сироватки крові у розведенні 1:500 (РІД-позитивні та РІД-негативні відповідно); 3, 4 – сироватки молока (у розведенні 1:20) від РІД-позитивних (3) та РІД-негативних корів (4). По осі ординат - зміна резонансного кута.

Таким чином, показана можливість виявлення індукованих вірусом лейкозу антитіл у сироватці молока хворих тварин за допомогою імуносенсора на основі ППР [76, 77]. Доведено, що імуносенсорний аналіз є

більш чутливим, ніж традиційний метод РІД. Мінімальним розведенням сироваток молока при експресному визначенні специфічних антитіл в молоці за допомогою ППР слід вважати 1:20.

Слід додати, що загальний час аналізу імунним сенсором складає лише 40 хвилин, включаючи час на іммобілізацію антигену на поверхні чутливого елементу, блокування вільних місць зв'язування та промивання вимірювальної комірки. Сама ж процедура тестування сироваток не перевищує 10 хвилин.

7.4. Застосування приладів для потреб промисловості

7.4.1. Оптимізація складу фотополімеризаційних полімерних композицій для оптико-електронної промисловості

Фотополімеризаційноздатні клейові композиції (ФПК) широко використовуються в точному приладобудуванні для з'єднання склеюванням оптичних деталей. Для склеювання оптичних деталей до них пред'являються наступні вимоги [78]:

1. Прозорість і безбарвність. У ряді випадків потрібна підвищена прозорість для променів певної частини спектра;
2. Світлостійкість – збереження прозорості та безбарвності із часом і під впливом зовнішніх умов;
3. Близькість показника заломлення і спектральних характеристик клею та деталей, що з'єднуються.

Полімеризація ФПК протікає під дією УФ-випромінювання в діапазоні довжин хвиль від 250 до 405 нм. Переважна кількість ФПК має пік поглинання в діапазоні 360-370 нм. Такий спосіб з'єднання має ряд переваг у порівнянні з іншими способами з'єднання оптичних деталей, а саме дає можливість:

- на десятки годин скоротити витрати часу на операцію складання;
- усунути температурного вплив на деталі, що з'єднуються;

- юстувати оптичні деталі безпосередньо перед склеюванням.

Додавання до складу ФПК низько дисперсних наповнювачів зменшує усадку клею після полімеризації, знижує внутрішні напруження в зоні з'єднання оптичних деталей та підвищує надійність з'єднання. Крім того, нанорозмірні наповнювачі підвищують швидкість процесу полімеризації, що є вигідним з точки зору технологічності і економічності виробництва оптичного обладнання. Тому, існує проблема визначення ПЗ ФПК та швидкості їх полімеризації в процесі розроблення та випробовування нових ФПК для потреб промисловості.

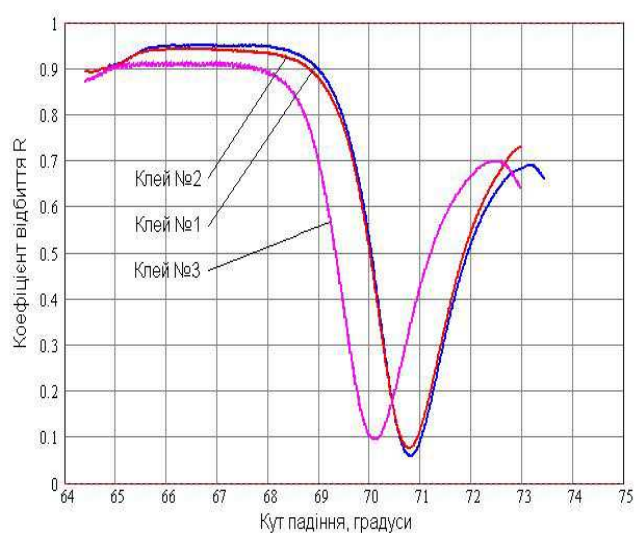
Зразки ФПК відрізнялись між собою складом наповнювачів. Склад досліджуваних композицій характеризувався наявністю основного полімеризаційноздатного олігомерного продукту: олігоуренанакрилату на основі аліфатичного діізоціанату ОУА на ІЗФ (ізофорондіізоціанат). В якості активного мономеру-розбавлювача було обрано триетиленглікольдиметакрилат (ТГМ-3), і синтез уретанакрилатного продукту було проведено в середовищі мономеру. В результаті було одержано 65% розчин в ТГМ-3. Також цей активний розбавлювач використовувався цілеспрямовано для зниження в'язкості ФПК. В якості фотоініціаторів полімеризації у складі ФПК використовували Irgacure 651 (бензилдіметоксил-кеталь) та бензофенон. Включення в базову полімерну матрицю певної кількості структурованих фрагментів кремнійорганічного олігомеру (АД-1, АД-2) та метакрилату з третинною аміногрупою (аміноакрилат) формувало нанорозмірну систему з властивостями, котрі залежали від процентного вмісту домішки.

Таблиця 7.1
Процентний вміст наповнювачів в досліджуваних ФПК.

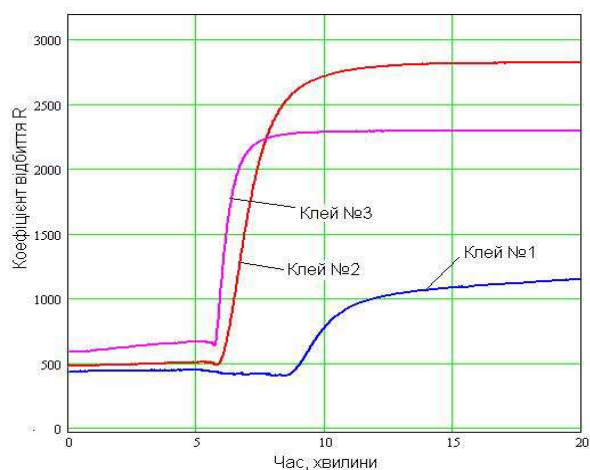
№	ОУА на ІЗФ	ТГМ-3	Irgacure 651	Бензофенон	Кремнійоргані чний акрилат (АД-1,АД-2)	Аміно акрилат
1	40	44	3	3	-	10
2	40	37	3	3	7 (АД-1)	10
3	40	37	3	3	7 (АД-2)	10

Для всіх зразків використовувалися ФПК з спектром поглинання в межах 340-380 нм (ближній ультрафіолет). Кожен зразок представляв собою скляну пластинку ЧЕ товщиною 1мм та розмірами 20×20 мм зі скла марки Ф1 ($n = 1,61$) з золотим шаром, на який був нанесений відповідний ФПК. Спочатку було виміряно криві ППР з неpolімеризованими ФПК (Рис. 7.21, а). Далі було виконано полімеризацію клею протягом 20 хв. (Рис. 7.21, б).

Під час полімеризації виконувалось вимірювання кінетики зсуву кривої ППР в режимі Slope.



а)



б)

Рис. 7.21. Експериментальні залежності $R(\theta)$ від типу смоли АД (а) та кінетика полімеризації в режимі Slope (б) досліджуваних зразків ФПК[79].

Досліджувані зразки характеризувались різними швидкостями полімеризації, про що свідчила зміна коефіцієнту відбиття. За результатами числових розрахунків було визначено ПЗ для клеїв до та після полімеризації (Таб. 7.2).

Таблиця 7.2

Результати вимірювань ПЗ та швидкості полімеризації ФПК

№ зразку	До полімеризації		Після полімеризації		Відносна зміна,		$\Delta N_A/\Delta t$
	Θ_{\min}	ПЗ, RIU	Θ_{\min}	ПЗ, RIU	%		$\times 10^{-3}$
	град		град		$\delta \Theta_{\min}$	δN_A	$\times 10^{-3}$
1	70,82	1,4615	70,84	1,4628	0,03	0,0088	0,43
2	70,77	1,4602	72,42	1,4786	2,33	1,3559	3,96
3	70,11	1,4507	71,13	1,4629	1,46	0,8437	6,12

В Таблицю 7.2. також занесені значення кутів ПВВ (Θ_B) та кутів мінімуму кривих ППР (Θ_{\min}) до і після полімеризації. Також вказані відносні зміни значень кута мінімуму ППР $\delta \Theta_{\min}$ та ПЗ досліджуваних зразків δn_A . Експериментально було підтверджено, що додавання кремнійорганічного олігомери підвищило швидкість полімеризації і ПЗ ФПК.

Використовуючи явище ППР, вдалось з високою точністю (абсолютна похибка становила $\pm 5 \cdot 10^{-5}$ RIU) визначити ПЗ досліджуваних ФПК до та після їх полімеризації та визначити швидкості полімеризації, що забезпечило високу якість продукції склеюваних оптичних деталей і відповідність клейового шва технічним вимогам до цього з'єднання [79].

7.4.2. Контроль синтетичних моторних олиив при їх експлуатації

Мастильні матеріали широко використовуються в транспортних цехах приладобудівних підприємств та загалом в машинобудуванні для зменшення тертя в рухомих механізмах двигунів, редукторів та при обробці деталей різанням. Враховуючу широку сферу використання мастильних матеріалів,

існує проблема контролю їх якості в процесі виробництва та експлуатації. Значну частку мастильних матеріалів складають моторні оливи. Одним з найбільших споживачів моторних олив є автомобільна промисловість. Розвиток сучасної техніки, поява нових конструкторських рішень в автомобілебудуванні та підвищення вимог до дотримання екологічних норм і стандартів, стимулюють вдосконалення моторних олив. Як наслідок збільшується частка моторних олив з властивостями швидкого біорозкладання, що в свою чергу зменшує термін їх експлуатації. Підвищення потужності двигунів призводить до зростання питомих термічних навантажень на моторну оливу, що прискорює процес її окислення. З метою запобігання випаданню в осад продуктів окислення в оливу вводять мийно-диспергуючі присадки - поверхнево-активні речовини, які утримують продукти окислення в колоїдному стані. З часом присадки вичерпуються і настає різке зниження експлуатаційних характеристик моторної оливи, продукти окислення починають випадати в осад і порушувати теплообмін, знижувати продуктивність системи фільтрації, збільшувати в'язкість оливи і впливати на її антифрикційні властивості. Такий стан моторної оливи свідчить про необхідність її заміни. В сучасних легкових автомобілях терміни заміни моторної оливи регламентовані сервісною книжкою і становлять 10-15 тис. кілометрів експлуатації. Тому є актуальними дослідження моторних олив в процесі їх використання для визначення стану їх окислення та наявності продуктів зносу.

Аналіз літератури показав, що в процесі експлуатації моторної оливи внаслідок окислення підвищується її оптична щільність, яка визначається вимірюванням спектрів пропускання моторних олив. Такий метод дозволяє визначити ступінь окислення, але не дає інформацію про продукти зносу та окислення, що випали в осад. Для вирішення цієї задачі використовують методи котрі базуються на зважуванні, але такі методи не дозволяють вимірювати невеликі концентрації продуктів зносу та окислення (менші за

10 мкг/мл) та потребують додаткових часових витрат для їх накопичення, що особливо недоцільно на етапі проектування механізмів машин з метою їх оптимізації для підвищення зносостійкості.

Об'єктами дослідження були два зразки синтетичної моторної оливи марки Mobil Super 3000 fe sw-30: зразок 1 – свіжа (невикористана) олива і зразок 2 – відпрацьована, після 3 тис. км пробігу автомобіля. Виходячи з припущення, що продукти зносу під силою тяжіння будуть осідати на дно вимірювальної кювети ППР-приладу, в якому знаходиться моторне мастило в процесі вимірювання ПЗ, було запропоновано провести вимірювання кінетики (зміни в часі) ПЗ досліджуваних зразків. Для визначення ПЗ зразки моторної оливи поміщали в двоканальну вимірювальну кювету приладу «Плазмон-71»: в один канал відпрацьовану моторну оливу, в іншій свіжу. Обсяг кожного каналу кювети становив 70 мкл. Вимірювання проводилися одночасно для двох зразків при однакових умовах, що зменшувало методичну помилку результатів вимірювання. Спочатку було виміряно криві ППР для обох зразків (Рис. 7.22), а потім кінетика мінімумів ППР протягом 20 хвилин (Рис. 7.23).

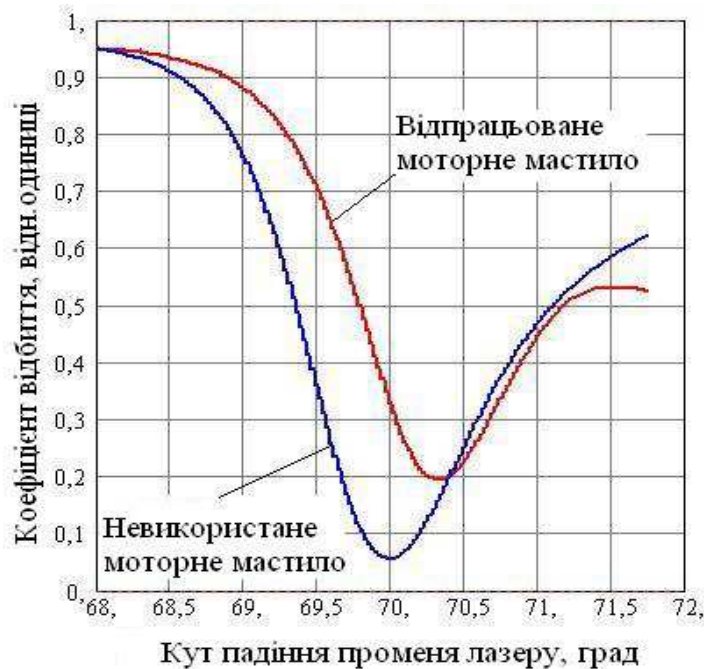
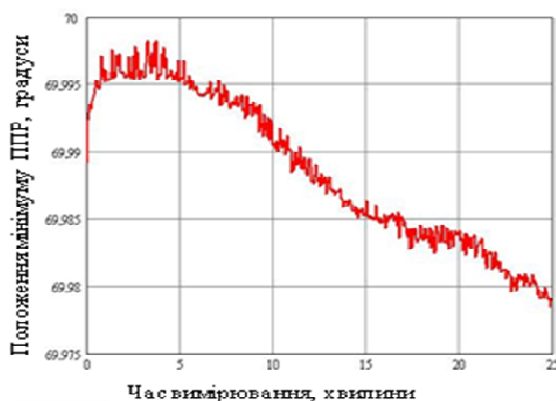


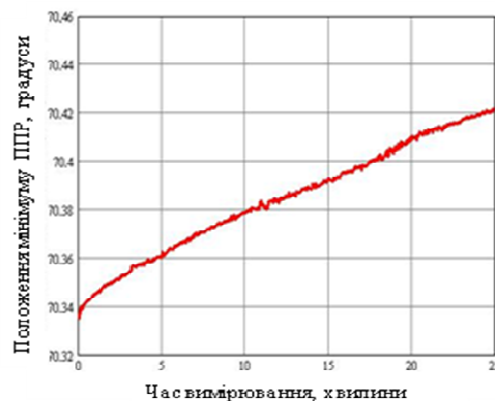
Рис. 7.22. Виміряні залежності $R(\theta)$ двох зразків моторної оливи Mobil Super 3000 fe sw-30: невикористаної та відпрацьованої після 3 тис. км. [80].

При вимірах проби олив нагрівались на кілька градусів. За рахунок нагріву ПЗ свіжої моторної оливи зменшився з 1,46912 до 1,46891, що було пов'язано зі зниженням її густини, оскільки температурний коефіцієнт об'ємного розширення є від'ємний, а саме: $-6 \times 10^{-4} \text{ K}^{-1}$.

Значення мінімуму кривої ППР для відпрацьованої моторної оливи з часом зростає з 70,335 градусів до 70,422 градусів, що відповідає збільшенню ПЗ на $1,05 \cdot 10^{-3}$ зі значення 1,47318 до значення 1,47423. Це пов'язано з осіданням дрібнодисперсних частинок продуктів окислення та зносу на поверхню ЧЕ [80].



а)



б)

Рис. 7.23. Виміряна кінетика мінімуму залежності $R(\theta)$ зразків моторної оливи Mobil Super 3000 fe sw-30: невикористаної (а) та відпрацьованої (б) після 3 тис. км. [80].

Наявність продуктів зносу та окислення було додатково підтверджено оптичною мікроскопією. Експериментально було визначено, що зростання ПЗ відпрацьованої оливи мало лінійний характер та становило $4 \cdot 10^{-5} \text{ хв}^{-1}$, а для свіжої моторної оливи внаслідок підігріву елементами конструкції приладу спостерігається температурний дрейф ПЗ моторної оливи зі швидкістю $-8 \times 10^{-6} \text{ хв}^{-1}$.

Запропонований спосіб контролю моторних олив методом ППР дозволив не тільки визначити різницю між свіжою та відпрацьованою

моторними оливами, а також визначати наявність продуктів зносу та окислення.

7.4.3. Контроль задимлення повітря виробничих приміщень

Світовий досвід показує, що визначальним чинником пожежі в приміщеннях та в салонах громадського та спеціального транспорту є дим, тому актуальним напрямком науково-технічних досліджень є вдосконалення та розробка нових димових автономних сповіщувачів побудованих на основі детекторів задимленості. Відомо, що точкові димові детектори задимленості бувають іонізаційними і оптико-електронними. Так як іонізаційні детектори задимленості містять радіоактивні речовини, рівень радіації від котрих перевищує фоновий рівень, вони отримали обмежене коло використання. Тому їх виробництво, експлуатація, а, головне, утилізація у всіх країнах світу стикається з безліччю труднощів, які відсутні у оптико-електронних детекторів задимленості. В оптико-електронних детекторах задимленості використовується ефект розсіювання випромінювання інфрачервоного світлодіода частинками диму чи пилу. Відомі оптико-електронні детектори задимленості, що містять оптичний модуль, який складається з світловипромінювача, світлоприймача та вимірювальної камери. При наявності диму в робочій камері випромінювання розсіюється на складових частках диму, і тому світлоприймач реєструє зменшену інтенсивність випромінювання. Такі детектори задимленості є малогабаритними, швидкодіючими, споживають невелику кількість електричної енергії. До їх недоліків належить те, що при наявності пилу вони дають хибний сигнал, тому що не розрізняють частки пилу від часток диму. Для зменшення вірогідності хибного спрацювання оптико-електронного детектора задимленості його роблять багатоканальним, з різними розмірами встановлення приймачів випромінювання за довжиною кожного каналу. Це дозволяє зменшити ймовірність хибних сигналів, але не повністю виключає

можливість їх виникнення. Тому було запропоновано вдосконалити оптико-електронний детектор задимленості, додавши ще додатковий інформаційний канал, що працює на основі явища ППР.

Конструктивно вдосконалений оптико-електронний детектор задимленості (Рис. 7.24) складається з напівпровідникових сенсорів температури (1), діодних випромінювачів (2) та лазерного джерела випромінювання (3), фотоприймачів, які вимірюють інтенсивність розсіяння і відбитого випромінювання (6), напівциліндричної призми ПВВ з нанесеним на неї металевим шаром (золота чи алюмінію) товщиною 50 нм (7), блока керування та обробки інформації (4), системи сповіщення (5) та блоку живлення (8). Запропонований детектор задимленості працює наступним чином. При появі в робочій зоні задимленості на частинках диму виникає розсіювання світла від випромінювачів (2), що призводить до появи сигналу на виході фотоприймачів (6), які фіксують розсіяне світло під різними кутами. Сигнал від фотоприймачів (6) надходить до блока керування та обробки виміряної інформації (3).

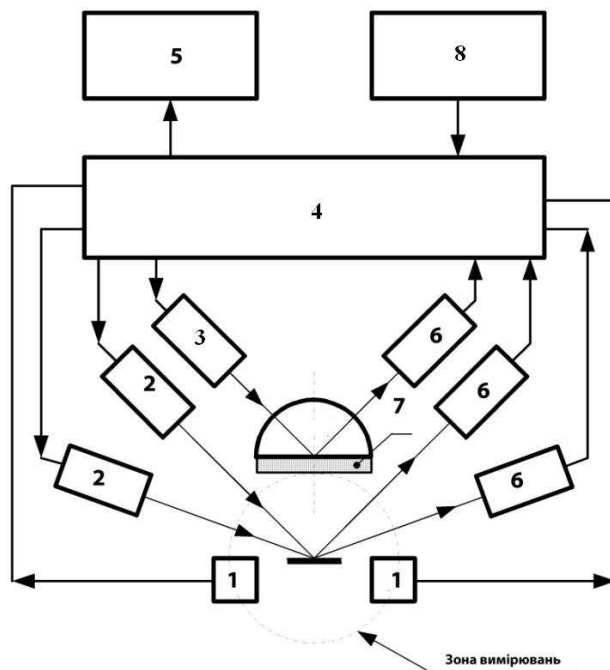


Рис.7.24. Структурна схема детектора задимленості [81].

Для забезпечення унеможливлення хибного спрацювання багатоканального детектора додатково застосований ЧЕ ППР на напівциліндричній призмі ПВВ (7), який реагує більшою мірою на газоподібні продукти горіння. При цьому кут падіння випромінювання від джерела (2) та кут відбиття на фотоприймач (6) обрано з попередніх досліджень чутливості ППР до газоподібних продуктів горіння. При потраплянні, наприклад, оксиду вуглецю на ЧЕ (8) змінюється інтенсивність відбитого світла від лазера (2), що змінює сигнал на виході фотоприймача (6), котрий надходить до блока керування та обробки вимірної інформації (3). Додатково встановлено напівпровідникові сенсори температури (1), які реагують на підвищення температури в зоні вимірювання, що супроводжує загоряння. Сигнал зміни температури в робочій зоні також надходить до блока керування та обробки вимірної інформації (3). Живлення детектора відбувається за допомогою блока (5). Отримана інформація від трьох фізично розрізнених каналів (перший канал на основі залежності розсіяння світла від твердих часток диму, другий канал на основі виявленої чутливості ППР до газоподібних продуктів згоряння і третій канал температурний) обробляється у блоці (3), який видає сигнал пожежної небезпеки на сповіщувач (4). У випадку запилення сигнал прийде тільки з фотоприймачів (6), що буде недостатньою умовою для вмикання системи сигналізації та передачі сигналу про пожежу диспетчеру.

Реалізацію запропонованого технічного рішення проводили на робочому макеті згідно зі схемою, наведеною на рис. 7.24. Макет складався з трьох блоків: блока контролю температури, блока оптичного контролю задимленості та блока контролю задимленості на явищі ППР. Блок контролю температури складався з двох високочутливих малогабаритних напівпровідникових датчиків температури (1), котрі були розроблені в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України.

Оптичний блок контролю складався з двох світлодіодів АЛ307А (2), розташованих під кутами 45° і 25° градусів та двох фотоприймачів ФД-24К (6), котрі були розташовані під такими ж кутами для вимірювання розсіяного світла на мікрочастинках диму. У якості ЧЕ контролю задимленості був використаний прилад "Плазмон-71". Для перевірки роботи макету в спеціально обладнаному приміщенні штучно створювали умови, наближені до умов початку пожежі та задимленості. Ці умови моделювалися запаленням сигарет та запаленням бавовни. Задимленість викликала появу сигналу на виходах всіх вимірювальних блоків.

Вимірювання кінетики зміни інтенсивності відбитого від ЧЕ світла вимірювалась в режимі Slope приладу «Плазмон-71». Один канал вимірювальної кювети приладу був робочий, а інший референтний, тому був закритий від зовнішніх впливів і реагував лише на нагрів ЧЕ внаслідок контакту з аналітом. У якості аналітів було застосовано наступні речовини, а саме:

1. Продукти горіння паперових виробів та деревини;
2. Вологе підігріте кімнатне повітря;
3. Насичені пари етанолу та ацетону;
4. Пил кімнатний сухий.

Послідовність етапів дослідження була наступною, а саме:

1. Вимірювали базову лінію для кімнатного повітря на протязі 1 хвилини;
2. Над ЧЕ створювали штучно задимленість продуктами горіння на протязі декількох секунд;
3. Прибирали джерело горіння з робочої зони та очищували її кімнатним повітрям;
3. Над ЧЕ створювали штучно підвищену вологість, розташовуючи біля ЧЕ резервуар з гарячою водою, котра інтенсивно випаровувалась;
4. Прибирали джерело вологого підігрітого повітря з робочої зони та очищували її кімнатним повітрям;

5. Над ЧЕ за допомогою плунжерного насосу розпилювали пари етанолу різної концентрації з послідовним очищенням робочої зони кімнатним повітрям;
6. Повторювали п.5 для парів ацетону різної концентрації;
7. Виконували завершальне очищення повітря робочої зони.

Експериментальним чином було визначено, що реакція ЧЕ на зміну типу аналіту характеризується не тільки величиною амплітуди відгуку, а також і знаком. Референтний канал давав відгук лише одного знаку і реагував тільки на зміну температури поверхні ЧЕ, в той час як робочий канал реагував як на зміну температури аналіту, так і на зміну його ПЗ.

На основі одержаних експериментальних даних була складена таблиця алгоритму роботи вдосконаленого детектора задимленості (Таб. 7.3).

Таблиця 7.3

Алгоритм роботи детектора задимленості

№	Назва каналу	Джерела реакція датчика задимленості				
		Вологе повітря	Запилення приміщення	Пари розчинників	Гаряче повітря	Задимленість приміщення
1	ППР кан. 1	1	0	0	0	1
2	ППР кан. 2	0	0	1	0	1
3	Оптичний	1	1	1	0	1
4	Температур.	1	0	0	1	1

Селективність датчика задимленості забезпечувалась тим, що вихідні сигнали вимірювальних каналів датчика задимленості для зовнішніх впливів формували різні комбінації на вході блоку обробки (Таб. 7.3).

Таким чином, вперше було розроблено спеціалізований багатоканальний датчик задимленості з використанням явища ППР [81]. Датчик задимленості має три інформаційні канали: від давачів температури, давачів інтенсивності світла та давача на основі явища ППР. Наявність трьох інформаційних

каналів в датчику дозволяє відокремити вплив температури, часток пилу, та продуктів горіння, внаслідок чого відсутнє хибне спрацювання створеного датчику задимленості.

Вище наведене широке коло застосування ППР-приладів дає можливість стверджувати про актуальність розвитку цього науково-технічного напрямку та подальшого впровадження ППР-приладів.

РОЗДІЛ 8

ВІТЧИЗНЯНІ ПРИЛАДИ НА ОСНОВІ ЯВИЩА ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

В Інституті фізики напівпровідників ім.В.Є.Лашкарьова Національної академії наук України експериментальні дослідження прикладних аспектів побудови біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу були розпочаті на початку 90-х років під керівництвом д.ф.-м.н., професора Ю.М. Ширшова. Конструктивно завершена модель спектрометра ППР, придатна для експлуатації в умовах лабораторій біохімічного та біофізичного профілю, була розроблена наприкінці дев'яностих років. Створений у ході робіт прилад було покладено в основу модельного ряду спектрометрів ППР серії "ПЛАЗМОН", які успішно експлуатуються в багатьох лабораторіях України та за її межами.

Один з перших зразків прототипу біосенсора показано на рис. 8.1.

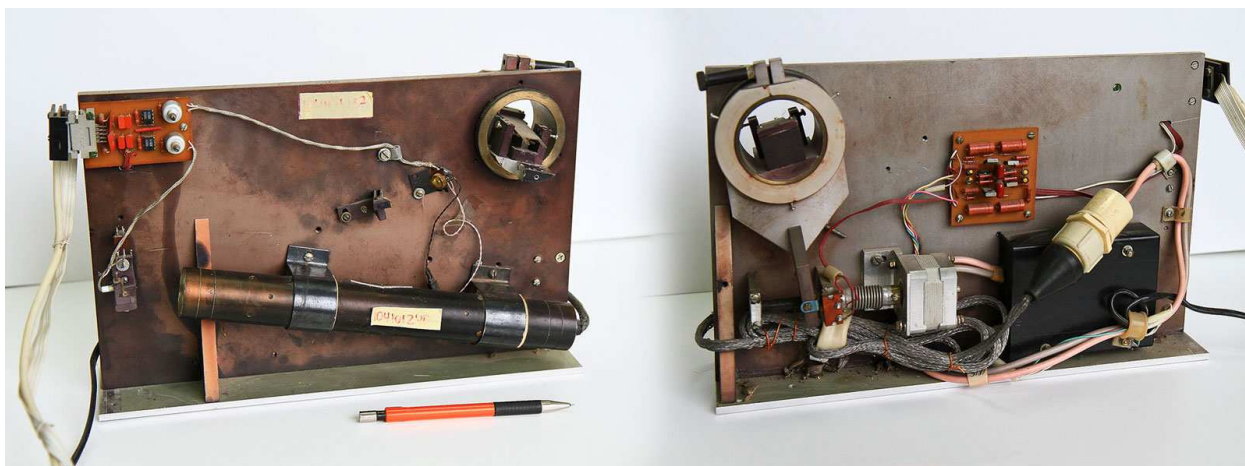
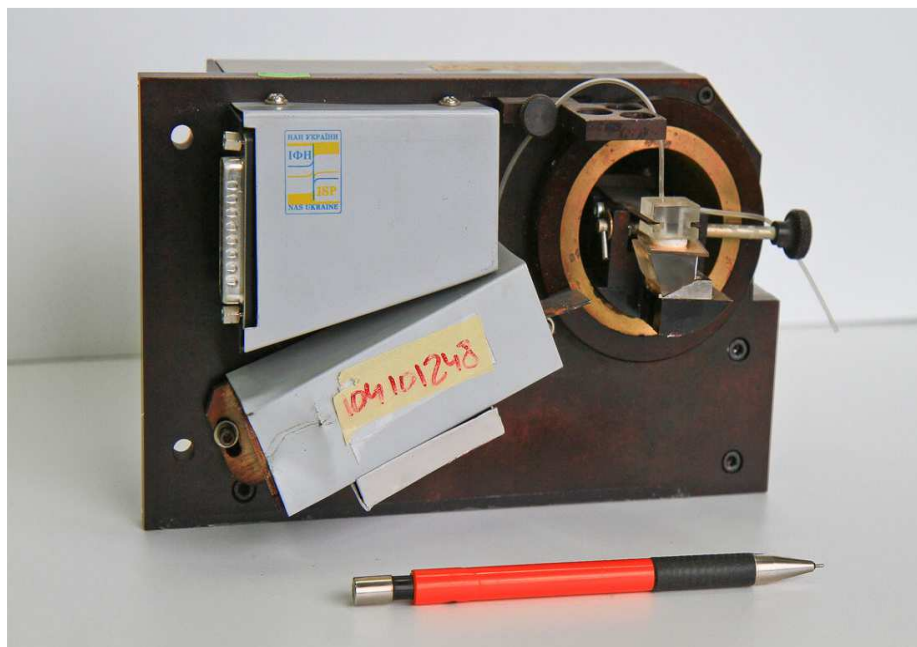


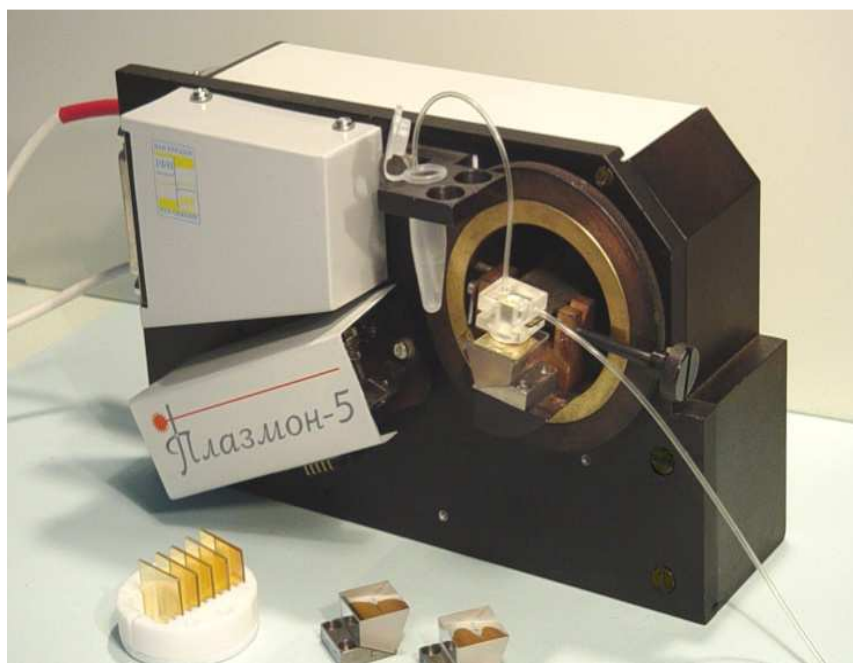
Рис. 8.1. Зовнішній вигляд біосенсору «Плазмон-1».

Практика роботи з цими приладами як в нашому інституті так і в різних установах світу дозволила приступити до розробки та виготовлення більш досконалих біосенсорів серії «Плазмон». Такі прилади, придатні для

експлуатації в умовах лабораторій біохімічного та біофізичного профілю, були розроблені наприкінці дев'яностих років (рис.8.2).



а)



б)

Рис. 8.2. Зовнішній вигляд біосенсорів «Плазмон-4» (а) та «Плазмон-5» (б).

Біосенсор «Плазмон-5» перший серійно спроможний біосенсор на основі ефекту поверхневого плазмонного резонансу, що був розроблений в ІФН ім.В.Є.Лашкарьова НАН України. До роботи над цим проектом були залучені висококваліфіковані фізики, програмісти та приладобудівники, які надалі склали ядро науково-виробничої групи, що продовжувала подальший розвиток рефрактометрії ППР та її застосувань у наукових дослідженнях. Створений у подальшому прилад «Плазмон-6» (рис. 8.3) було покладено в основу модельного ряду спектрометрів ППР серії "Плазмон".

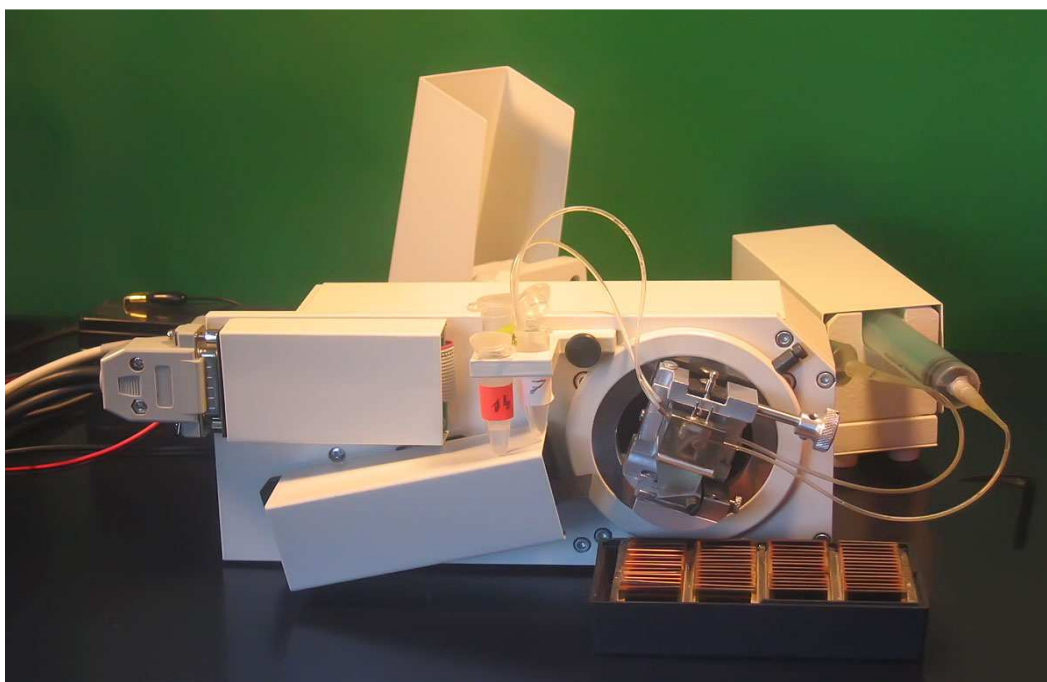
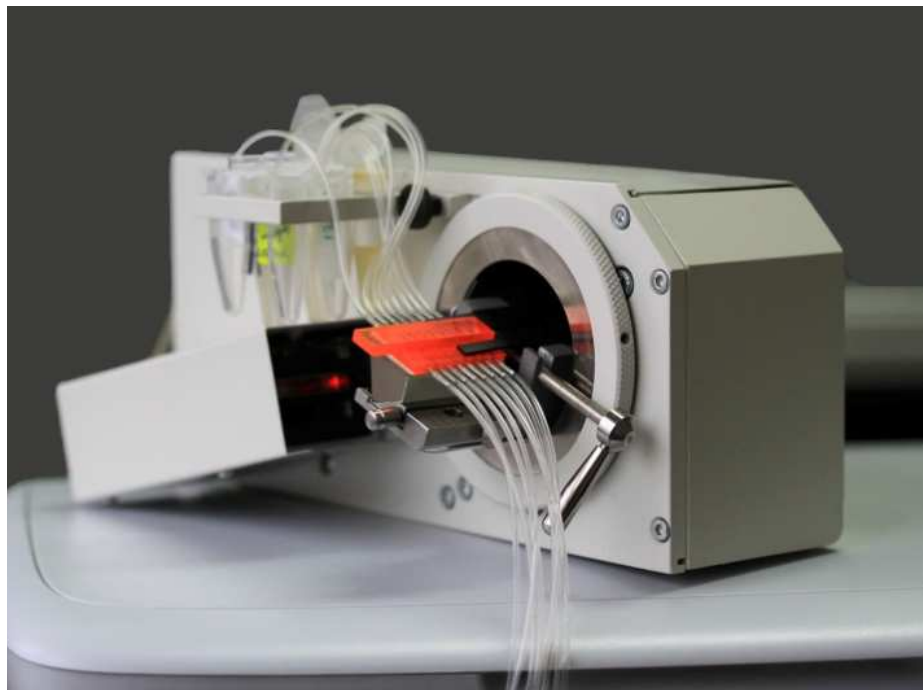


Рис. 8.3. Зовнішній вигляд біосенсора «Плазмон-6».

На сьогодні модельний ряд включає двоканальні прилади «Плазмон-6», «Плазмон-7» та «Плазмон-71» та «Плазмон-9», восьми канальний «Плазмон-8» (рис. 8.4), та спеціалізований прилад, призначений для виявлення лейкозу великої рогатої худоби «Лейкоплазм-2». Біосенсиори серії «Плазмон» успішно експлуатуються в багатьох лабораторіях України та за її межами.



а)

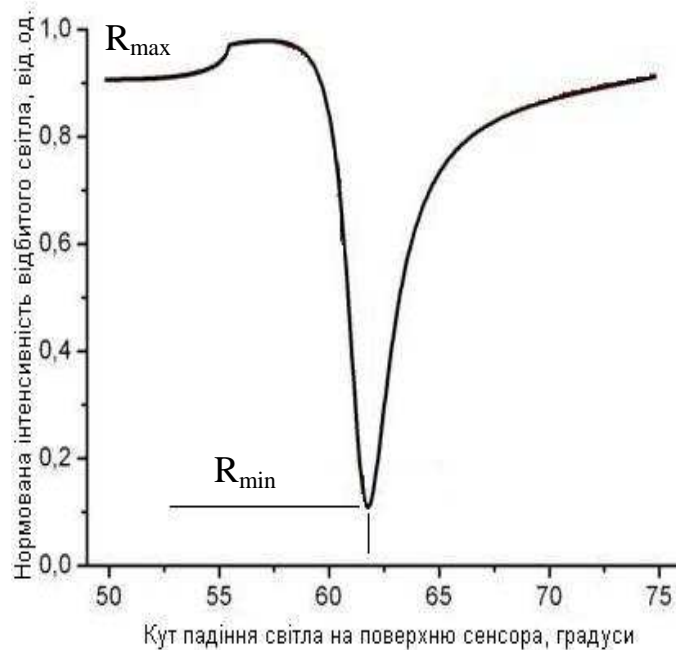


б)

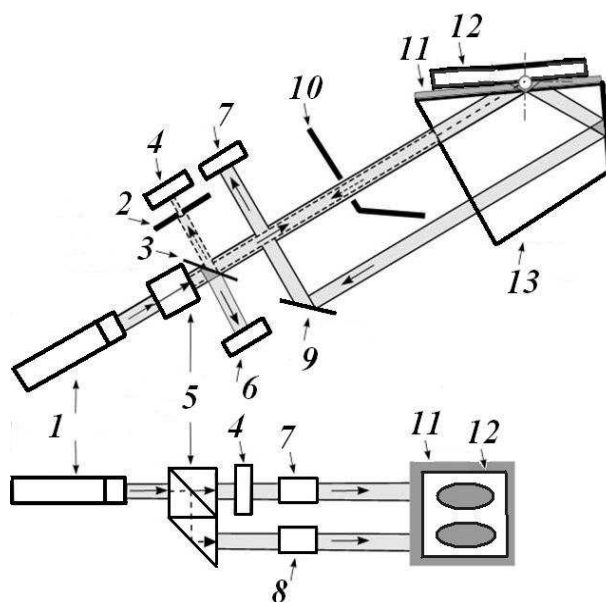
Рис. 8.4. Зовнішній вигляд експериментальних зразків спеціалізованих біосенсорів «Лейкоплазм-2» (а) та «Плазмон-8» (б).

Оптична схема біосенсора «Плазмон-6» показана на рис.8.5. Робочу поверхню ЧЕ приладів серії «Плазмон» формує плівка золота товщиною 48...52 нм. Джерелом збудження є р-поляризоване світло від напівпровідникового інжекційного лазерного діоду з довжиною хвилі 650 нм.

Необхідні умови для збудження поверхневого плазмону забезпечуються зміною кута падіння на поверхню ЧЕ променю світла від лазера. Кутова залежність інтенсивності світла, відбитого від поверхні ЧЕ, є основною вихідною характеристикою приладу (Рис. 8.5,а).



а)



б)

Рис. 8.5. Типова характеристика відбиття $R(\theta)$ при явищі ППР (а) та оптична схема приладів серії «Плазмон» (б).

Оптична схема приладу (Рис. 8.5,б.) побудована за геометрією Кречмана і складається з лазерного діоду 1, ЧЕ 11, напівпентапризми 13, та двох фотоприймачів (7, 8). Світло від лазерного діоду проходить через напівпентапризму 13, відбивається від поверхні ЧЕ 11, дзеркала на задній грані призми, додаткового дзеркала 9 та потрапляє на фотоприймач 7. Плівка золота нанесена на скляну пластинку, з'єднану з ретропризмою імерсійною рідиною. Побудова кривої ППР виконується обертанням ретропризми та одночасним вимірюванням інтенсивності відбитого від ЧЕ світла. Канали сформовані вимірювальною кюветою 12 з поліметилметакрилату, котра встановлюється на ЧЕ через силіконову прокладку. Для збудження поверхневих плазмонів в обох каналах світло від лазерного діоду розділяється на два промені призмою 5. Контроль та стабілізація інтенсивності лазера забезпечуються фотоприймачем 6 та електронікою приладу відповідно. Калібрування абсолютного кута виконується фотоприймачем 4 з діафрагмою 2 (шириною щилини 100 мкм) через вимірювання інтенсивності відбитого світла від передньої грані призми. Вимірювання інтенсивності лазера та калібрування кута забезпечують поділяюча пластинка 3 та діафрагма 10. Всі елементи оптичної схеми, окрім призми, ЧЕ та вимірювальної кювети, формують окремий вузол – оптичний блок 1 (Рис. 8.6). Кутове сканування та визначення мінімуму кривої ППР здійснюється в діапазоні кутів 38...69 градусів обертанням напівпентапризми на платформі-тримачі 2 за допомогою крокового двигуна 4 та редуктора 3.

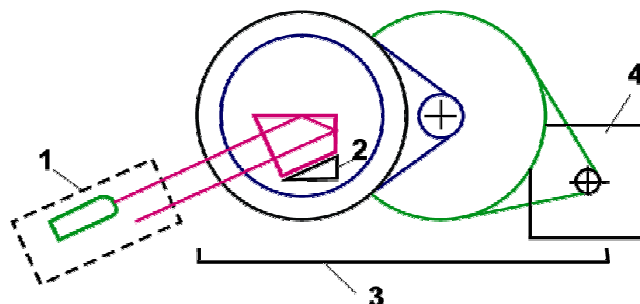


Рис.8.6. Кінематична схема передачі обертального руху для визначення кутового положення мінімуму характеристики $R(\theta)$ приладу «Плазмон».

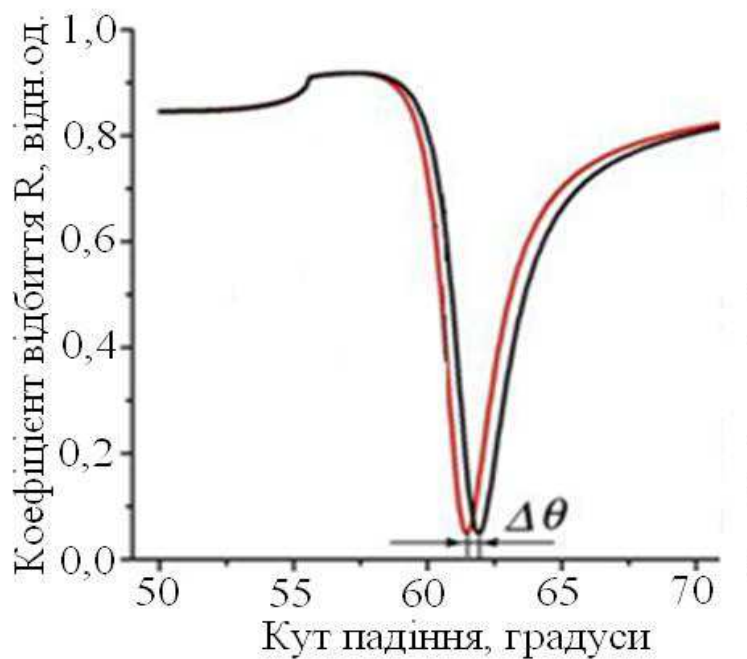
Використання ретровідбиваючої напівпентапризми дозволило сконструювати оптичний блок у вигляді завершеного змінного конструктиву, що включає джерело випромінювання (напівпровідниковий лазер), світлоділник, робочі детектори-фотодіоди, додаткові фотоприймачі контролю інтенсивності лазерного променя та системи точного калібрування кута падіння світла на робочу грань призми. В ньому також встановлено підсилювачі, схеми стабілізації та модуляції лазерного випромінювання, комутації сигналів тощо. Такий підхід є унікальним і дозволяє суттєво зменшити і спростити весь біосенсор. Розміри приладу $215 \times 100 \times 100$, маса не більше 3 кг.

На верхню грань ретропризми через імерсійну рідину встановлюється скляна пластина з нанесеною плазмон-підтримуючою тонкою плівкою золота (золота з сріблом) [22], котра захищена проточною або відкритою кюветою. На плівку металу з сенсорно чутливою поверхнею спрямовується лінійно поляризоване випромінювання, яким збуджується поверхневий плазмон-поляритон, а кювета забезпечує контакт плівки з досліджуваними рідиною чи газом. Ретропризма, що встановлена на поворотній платформі, може обертатися навколо вісі, що проходить точку падіння світла на плазмон-підтримуючу плівку, змінюючи таким чином кут падіння світла. Поворотна платформа зв'язана з кроковим двигуном прецизійним редуктором [23]. Максимальний кут повного сканування 17^0 за час не більше 2,5 с.

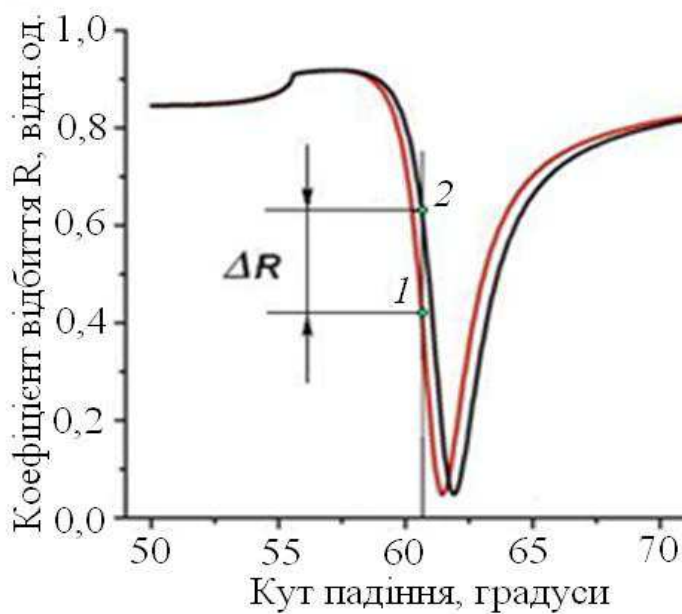
Наявність двох ідентичних каналів дозволяє або проводити два різних дослідження одночасно, або працювати за диференційною схемою, використовуючи один із каналів як опорний. Диференційні виміри значно підвищують реальну чутливість приладу завдяки виключенню впливу багатьох зовнішніх факторів, таких, як температура.

Для визначення ПЗ аналіту та його зміни в часі в приладі передбачено два режими роботи: Multiple і Slope (Рис. 8.7). В режимі Multiple виконується періодичне вимірювання кутового положення мінімуму кривої ППР, а в

режимі Slope – періодичне вимірювання інтенсивності відбитого світла при постійному куті його падіння.



а)



б)

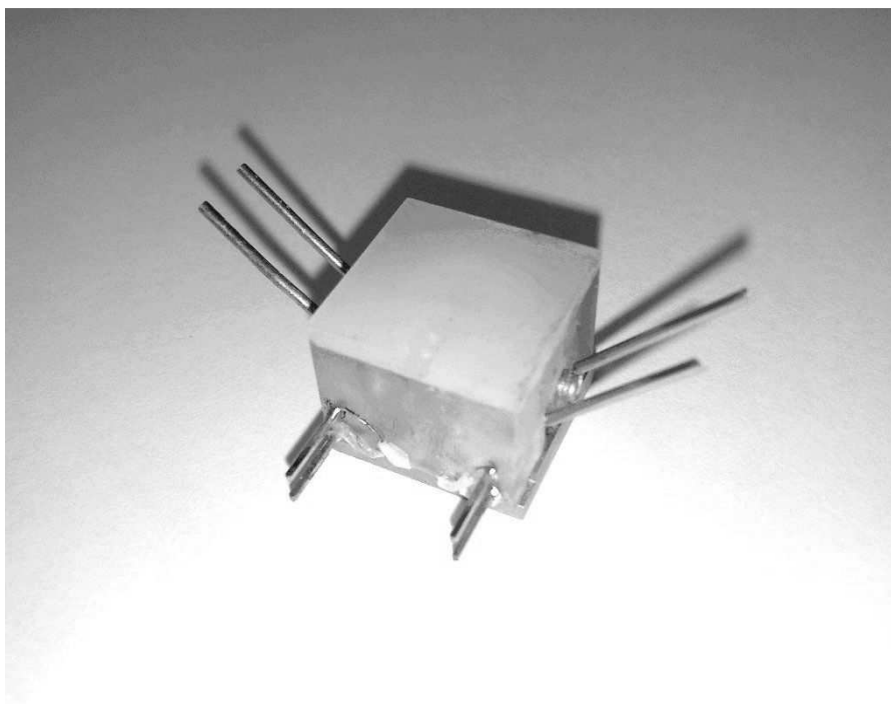
Рис. 8.7. Способи вимірювання приладом «Плазмон» зсуву мінімуму $\Delta\theta$ характеристики $R(\theta)$ (режим Multiple) (а) та зміни інтенсивності ΔR (режим Slope) (б).

Зміна показника заломлення аналіту викликає зсув кривої ППР з початкового положення (червона крива) у положення кінцеве (чорна крива). В режимі Multiple для визначення цього зсуву виконується періодичне кутове сканування та одночасне вимірювання інтенсивності відбитого від ЧЕ світла (визначення коефіцієнту відбиття). Також автоматично визначається кутове положення мінімуму ППР-кривої і таким чином вимірюється величина кутового зсуву $\Delta\theta_{\min}$.

Причому, перед визначенням $\Delta\theta_{\min}$ виконується операція апроксимації виміряної ППР-кривої поліномом 2 степеня в околі її виміряного мінімуму. Потім визначається кутове положення мінімуму апроксимуючого поліному.

В режимі Slope спочатку вимірюється вся крива ППР за допомогою кутового сканування, а потім на лінійному проміжку її лівого схилу задається робоча точка, яка характеризується певним кутовим положенням величиною θ_s . Значення величини θ_s обирається оператором приладу або визначається автоматично в точці де інтенсивність відбитого світла зменшується вдвічі, тобто за умовою, що коефіцієнт відбиття дорівнює $R_{50} = ((R_{\max} - R_{\min}) \cdot 0,5)$. При зміні показника заломлення аналіту резонансна крива зміщується і приладом вимірюється зміна інтенсивності відбитого світла ΔI_B (коефіцієнта відбиття ΔR) при постійному куті падіння θ_s . За величиною зміни $\Delta\theta_{\min}$ чи ΔR розраховується зміна показника заломлення аналіту ΔN_a .

Зручне для користувача програмне забезпечення проектує на екран не тільки кінетику процесів в обох каналах або їх різницю, а і сенсограми. Це є досить важливим тому, що будь-яка суттєва зміна сенсограми може означати якусь перешкоду, наприклад, утворювання повітряної кульки в кюветі. В приладах, які не показують сенсограми, така перешкода буде викликати зміни кінетичної кривої, що може бути інтерпретовано як зміни в досліджуваному зразку. Програмне забезпечення має вбудовані засоби контролю та юстирування оптичного каналу приладу.



a)



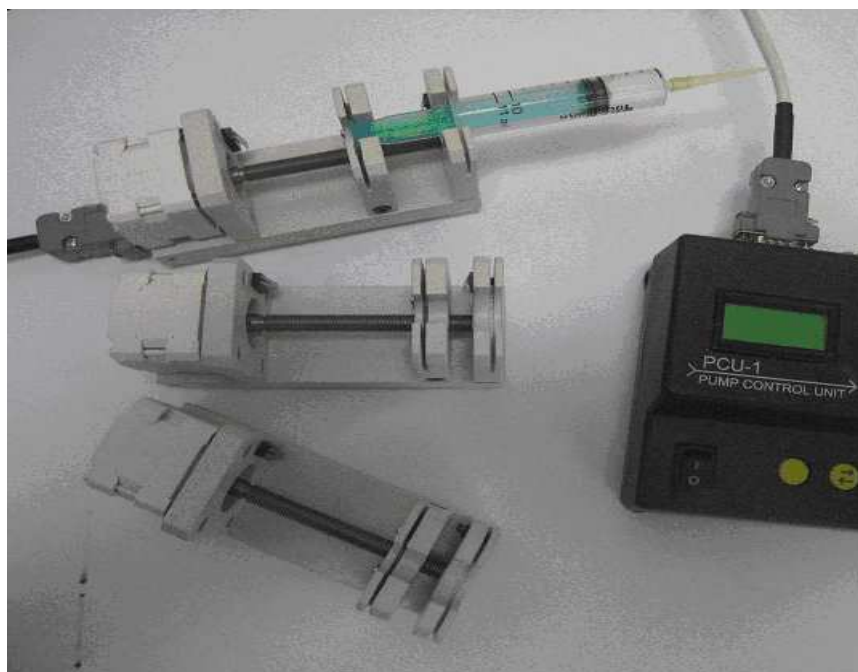
б)

Рис. 8.8. Термостабілізована комірка та термобокс

Для підвищення стабільності і збільшення можливостей біосенсорів було розроблено додаткове устаткування. Так, для всіх приладів є керовані програмно термостабілізовані комірки (рис.8.8), які дозволяють підтримувати їх температуру в діапазоні від кімнатної до 60^0 або 95^0 з точністю 0,10. Можлива зміна температури по заздалегідь заданій програмі. Розроблений також термобокс, здатний підтримувати стабільну температуру в робочій камері з вимірювальним приладом в діапазоні $-5^0 \dots +10^0$ відносно кімнатної температури.

Для стабільної подачі проби були розроблені одноканальні плунжерні та восьмиканальні перистальтичні насоси, здатні прокачувати рідину з швидкістю, починаючи з 1 мкл/хв. Насоси зображені на рис.8.9. Насоси можуть підключатись до біосенсорів «Плазмон» або працювати автономно.

Прилади серії «Плазмон» є універсальними приладами, призначеними для застосування у різних галузях та дослідженнях, працюють під керуванням ПК та мають складне та універсальне програмне забезпечення. Розроблене програмне забезпечення дозволяє максимально використати можливості приладів при роботі у лабораторних умовах. Версії приладу можуть бути здатними до довготривалої автономної роботи, що забезпечує можливості роботи у польових умовах. Прилади можуть мати автономне джерело живлення та спеціалізоване вбудоване програмне забезпечення, спрямоване на рішення конкретних завдань.



а)



б)

Рис. 8.9. Плунжерні (а) та перистальтичний насоси (б) для біосенсорів «Плазмон»

Подальший розвиток приладів серії «Плазмон» пов'язано з подальшою його спеціалізацією (чутливого елемента та методик вимірювання) і зменшення похибок вимірювання та підвищення чутливості на основі врахування конструкторсько-технологічних особливостей приладу.

ПОСИЛАННЯ

До передмови:

1. Sommerfeld A. Uber die Fortpflanzung elektrodynamischer Wellen entlang eines Drahtes // *Ann. der Physik und Chemie*. - 1899. - Vol.303. - P. 233-290.
2. Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philosophical magazine* 4: 396-402; (1902).
3. Zenneck J. Uber die Fortpflanzung ebener elektromagnetischer Wellen langs einer ebenen Leiterflache und ihre Beziehung zur drahtlosen Telegraphie // *Ann. der Physik*. - 1907. - Vol. 328. - P. 846-866.
4. Lord Rayleigh. Dynamical theory of the grating. *Proc.Roy.Soc. (London)* A79: 399 (1907).
5. Fano U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves) // *JOSA*. - 1941. - Vol. 31. - P. 213-222.
6. Ritchie R. H. Plasma losses by fast electrons in thin films // *Phys. Rev.* - 1957. - Vol. 105.- P. 874-881.
7. Powell, C. J. and Swan, J. B. Effect of oxidation on the characteristic loss spectra of aluminium and magnesium. *Physical Review* 18: (1960).
8. Pines, D and Bohm, D. A Collective Description of Electron Interactions. I. Magnetic Interactions. *Physical Review* 82: 625-634; (1951).
9. Pines, D and Bohm, D. A Collective Description of Electron Interactions: II. Collective vs Individual Particle Aspects of the Interactions. *Physical Review* 85: 338-353; (1952).
10. Pines, D and Bohm, D. A Collective Description of Electron Interactions: III. Coulomb Interactions in a Degenerate Electron Gas. *Physical Review* 92: 609-626; (1953).
11. Kretschmann, E. and Reather, H. Radiative decay of nonradiative surface plasmon excited by light. *Z.Naturf.* 23A: 2135-2136; (1968).

12. Kretschmann, E. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Z Phys* 241: 313-324; (1971).
13. Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z Phys* 216: 398-410; (1968).
14. Liedberg, B. et al Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Lab.Sensors Actuat.* 4: 299-304; (1983).
15. Pockrand, I. et al Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies. *Surface Sci.* 74: 237-244; (1978).
16. Peterlinz, K. A. and Georgiadis, R. Two-color approach for determination of thickness and dielectric constant of thin films using surface plasmon resonance. *Opt.Commun.* 130: 260-266; (1996).
17. Liedberg, B. et al Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B* 11: 63-72; (1993).
18. Zhang, L. and Uttamchandani, D. Optical chemical sensing employing surface plasmon resonance. *Electron Lett.* 23: 1469-1470; (1988).
19. Striebel, Ch. et al Characterization of biomembranes by spectral ellipsometry, surface plasmon resonance and interferometry with regard to biosensor application. *Biosens.Bioelectron.* 9: 139-146; (1994).
20. Rothenhausler B., Knoll W. Surface-plasmon microscopy // *Nature.* - 1988. - Vol. 332. - P. 615-617.
21. Cullen, D. C. et al. Detection of immunocomplex formation via surface plasmon resonance on goldcoated diffraction gratings. *Biosensors* 3: 211-225; (1987).
22. Lawrence, C. R. et al Surface plasmon resonance studies of immunoreactions utilizing disposable diffraction gratings. *Biosens.Bioelectron.* 11: 389-400; (1996).
23. Ebbesen T. W., Lezec H. J., Ghaemi H. F., Thio T., Wolff P. A. Extraordinary optical transmission through sub-wavelength hole arrays // *Nature.* - 1998. - Vol. 391. - P. 667-669.

24. Grupp D. E., Lezec H. J., Thio T., Ebbesen T. W. Beyond the Bethe Limit: Tunable Enhanced Light Transmission Through a Single Sub-Wavelength Aperture. - 1999. - Vol. 11. - P. 860-862.
25. Wannemacher R. Plasmon-supported transmission of light through nanometric holes in metallic thin films // Opt. Comm. - 2001. - Vol. 195. - P. 107-118.
26. A. Degiron, H.J. Lezec, N. Yamamoto and T. W. Ebbesen Optical transmission properties of a single subwavelength aperture in a real metal // Optics Comm. - 2004. - Vol. 239. - P. 61-66.
27. Genet C., Ebbesen T. W. Light in tiny holes // Nature. - 2007. - Vol. 445. - P. 39-46.
28. Lofas, S. and Johnsson, B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands. *J.chem.soc., chem commun.* 1526-1528; (1990).
29. Lofas, S. Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance. *Pure & Appl.Chem.* 67: 829-834; (1995).
30. Sjolander, S. and Urbaniczky, C. Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis. *Analytical Chemistry* 63: 2338-2345; (1991).
31. Lofas, S. et al Bioanalysis with surface plasmon resonance. *Sensors and Actuators B* 5: 79-84; (1991).
32. Stenberg, E. et al Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance by using radiolabelled proteins. *J.Colloid Interface Sci.* 143: 513-526; (1991).
33. Karlsson, R. et al Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system. *Journal of Immunological Methods* 229-240; (1991).
34. Liedberg, B. et al Biosensing with surface plasmon resonance - how it all started. *Biosens.Bioelectron.* 10: i-ix; (1995).

До розділу 1:

1. Nuno Miguel Matos Pires, Tao Dong , Ulrik Hanke, Nils Hoivik. Recent developments in Optical detection technologies in Lab-on-a-Chip devices for biosensing applications // *Sensors* **2014**, *14*, 15458-15479; doi:10.3390/s140815458
2. Бурлаенко Н.Л., Бударин Л.И., Покатаев В.Н., Погорелая Л.М. Химические пьезоэлектрические сенсоры для контроля азотосодержащих газов. - К.: УкрНИИНТИ Госплана Украины, 1991. – 26 с.
3. Золотов Ю.А. Химические сенсоры // Журнал аналитической химии. – 1990. - Т.45, №7. - С.1255-1259.
4. Lofas S., Malmquist M., Ronnberg I., et al. Bioanalysis with surface plasmon resonance // *Sensors and Actuators, B.* - 1991. – Vol.5, No.1. - P.113-121.
5. Morizumi T. Biomimetic systems based on non-selective sensor arrays // *Eurosensors IX.* - Stockholm (Sweden). – 1995. - Digest of technical papers.
6. Haug M., Schierbaum K.D., Gauglitz G., Gopel W. Chemical sensors based upon polysiloxanes: comparison between optical, quartz microbalance, calometric and capacitance sensors // *Sensors and Actuators, B.* – 1993. – Vol.11. - P.383-391.
7. Lofas S., Malmquist M., Ronnberg I., et al. Bioanalysis with surface plasmon resonance // *Sensors and Actuators, B.* - 1991. – Vol.5, No.1. - P.113-121.
8. Chen Z., Kaplan D.L., Gao H., et al. Molecular assembly of multilayer enzyme: toward the development of a chemiluminescence-based fiber optic biosensor // *Materials science and engineering, C.* - 1996. – Vol.4. - P.155-159.
9. Bergveld P., de Roij N.F. The history of chemically sensitive semiconductor devices // *Sensors and Actuators, B.* - 1981. – Vol.1. - P.5.
10. Bousse L., de Roij N.F. and Bergveld P. Operation of chemically sensitive field-effect sensors as a function of the insulator-electrolyte interface // *IEEE Trans. on Electron Devices.* – 1983. - Vol. ED-30, №.10. - P.1263-1270.

11. Hoffman B., Gadau M. Conductivity measurements with miniaturised thin film metal electrodes // Proc. of Eurosensors IX. – Stockholm (Sweden). – 1995. – P.837-840.
12. Laurell T. and Drott J. Silicon wafer integrated enzyme reactors // Biosensors and Bioelectronics. – 1995. – Vol.10 - P.289-299.
13. Каттралл Роберт В. Химические сенсоры. – М.: Научный мир, 2000. – с.25.
14. Jacob Fraden. Handbook of modern sensors: physics, designs and applications. Springer. – 2010. – 681 p.
15. Wanekaya, A. K.; Chen, W.; Myung, N. V.; Mulchandani, A. Nanowire-based electrochemical biosensors. *Electroanalysis* 2006, 18(6), 533–550.
16. Bakker, E.; Pretsch, E. Potentiometric sensors for trace-level analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 2005, 24(3), 199–207.
17. Binnig G, Quate CF, Gerber C (1986) Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 56:930–933.
18. Battiston FM, Ramseyer J-P, Lang HP, Baller MK, Gerber Ch, Gimzewski JK, Meyer E, Guntherodt H-J (2001) A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout, *Sens Actuators B Chem* 77:122–131.
19. Baselt DR, Fruhberger B, Klaassen E, Cemalovic S, Britton Jr, CL, Patel SV, Mlsna TE, McCorkle D, Warmack B (2003) Design and performance of a microcantilever-based hydrogen sensor. *Sens Actuators B* 88(2):120–131.
20. Hansen KM, Ji, H-F, Wu G, Datar R, Cote R, Majumdar A, Thundat T (2001) Cantileverbased optical deflection assay for discrimination of DNA single-nucleotide mismatches. *Anal Chem* 73:1567–1571.
21. Baselt DR, Lee GU, Natesan M, Metzger SW, Sheehan PE, Colton RJ (2001) A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosens Bioelectron* 13:731–739.

22. T. Strunz, K. Oroszlan, R. Schafer, H.-J. Guntherodt. Dynamic force spectroscopy of single DNA molecules // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, – 1999, – Vol.96, – pp.11277-11282.
23. Betts TA, Tipple CA, Sepaniak MJ, Datskos PG (2000) Selectivity of chemical sensors based on micro-cantilevers coated with thin polymer films. *Anal Chim Acta* 422:89–99.
24. Senesac LR, Yi D, Greve A, Hales JH, Davis ZJ, Nicholson DM, Boisen A, Thundat T. (2009) Micro-differential thermal analysis detection of adsorbed explosive molecules using microfabricated bridges. *Rev Sci Instrum* 80:035102.
25. Г.А. Киселев, Д.В. Багров, П.В. Горелкин, И.В. Яминский. Сенсор на основе атомно-силового микроскопа // *Сенсор*, – 2005, – No.4, – сс.22-26.
26. R. L. Johnson. Characterization of piezoelectric ZnO thin films and the fabrication of piezoelectric micro-cantilevers // *PhD Iowa State University Ames*, 2005.
27. Pinnaduwa LA, Wig A, Hedden DL, Gehl A, Yi D, Thundat T, Lareau RT (2004) Detection of trinitrotoluene via deflagration on a microcantilever, *J Appl Phys* 95:5871–5875.
28. Britton CL, Jones RL, Oden PI, Hu Z, Warmack RJ, Smith SF, Bryan WL, Rochelle JM (2000) Multiple-input microcantilever sensors. *Ultramicroscopy* 82:17–21.
29. Datskos PG, Oden PI, Thundat T, Wachter EA, Warmack RJ, Hunter SR (1996) Remote infrared radiation detection using piezoresistive microcantilevers, *Appl Phys Lett* 69 (20):2986–2988.
30. Sachse HB (1975) Semiconducting temperature sensors and their applications. Wiley-Interscience, New York.
31. Timko MP (1976) A two terminal IC temperature transducer. *IEEE J Solid-State Circuits* SC-11:784–788.

32. Nuno Miguel Matos Pires, Tao Dong , Ulrik Hanke, Nils Hoivik. Recent developments in Optical detection technologies in Lab-on-a-Chip devices for biosensing applications // *Sensors* **2014**, 14, 15458-15479; doi:10.3390/s140815458.
33. Прохоров А.М. Физическая энциклопедия. 1988. Т5
34. Drener G.S. Low-noise precision light detector for chemiluminescent sensor // *Opt. Express* 2010, 8, 564-572.
35. Hustafsson P. Absorption investigation of UV-light spectroscopy // *Phys. Rev.* 1995, 6, 2365-2369.
36. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology // *BioTechniques*. – 1991. – Vol.11 – P.620-627.
37. Фізичні основи поляриметрії високої інформативної здатності: монографія / Г. В. Бекетов, О. С. Климов, І. Є. Матяш та ін.; під.ред. Б. К. Сердеги. – К.: НТУУ «КПІ», 2013. – 252 с. – 100 пр.
38. Войтович И. Д. Сенсоры на основе плазмонного резонанса: принципы, технологии, применения. - К. : Сталь, 2011. - 534 с.
39. Woodbury R.G., Wendin C., Clendenning J., Mendelez J., Elkind J., Bartholomew D., Brown S., Furlong C. Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1998. – Vol.13 – P.1117-1126.
40. Surface Plasmon Resonance Based Sensors/Volume Editor: Jiri Homola. In: Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Series Editor: O. S. Wolfbeis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006.
41. H. Bai, R. Wang, B. Hargis, H. Lu, Y. Li. A SPR Aptasensor for Detection of Avian Influenza Virus H5N1 // *Sensors*. – 2012. – Vol.12. – PP. 12506-12518.
42. P.M. Boltovets, V.R. Boyko, B.A. Snopok. Surface capturing of virion-antibody complexes: Kinetic study // *Mat.-wiss.u.Werkstofftech.* – 2013. – Vol.44., No.2-3. – PP. 112-118. DOI 10.1002/mawe.201300106

До розділу 2:

1. Введение в физику твердого тела. Ч.Киттель. Перевод с четвертого американского издания А.А.Гусева и А.В.Пахнева под общей редакцией А.А.Гусева. Учебное руководство. Главная редакция физико-математической литературы издательства «Наука», М.,1978 г.
2. Маделунг О. Теория твердого тела: Пер. с нем./Под редакцией А.И.Ансельма. – М.: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1980.
3. Wert Ch.A., Thomson R.M. Physics of Solids / McGraw-Hill, 1964.
4. Гороновский И.Т.,Назаренко Ю.П., Некряч Е.Ф. Краткий справочник по химии / Киев: Наукова думка, 1987.
5. Таблицы физических величин. Справочник. / Под ред. акад. И.К.Кикоина – М.: Атомиздат, 1976.
6. Борн М., Вольф Э. Основы оптики / «Наука», Главная редакция физико-математической литературы, М.:1970.
7. Р.Фейнман, Р.Лейтон, М.Сэндс. Фейнмановские лекции по физике. Физика сплошных сред. – М.: Наука, 1961. - 286 с., ил.
8. P. Drude. Ellipsometrie // Ann. Phys. Chem. – 1890. – Vol.39. - P.481.
9. Р.І.Бігун, З.В.Стасюк. Електронна структура ультратонких плівок міді та золота//Фізика і хімія твердого тіла, т. 10, №2 (2009) С. 295-298.
10. Р.І.Бігун, З.В.Стасюк. Межі застосовності теорій квантового переносу в ультратонких плівках простих металів//Фізика і хімія твердого тіла, т. 10, №3 (2009) С. 586-587.
11. Johnson, P. and Christy, R. (1972). *Optical Constants of the Noble Metals*. Phys. Rev. B. 6, 4370.
12. Физическая энциклопедия/Гл. ред. А.М. Прохоров. Ред. кол. Д.М.Алексеев, А.М.Балдин, А.М.Бонч-Бруевич, и др. – М.: Большая Российская энциклопедия. Т.3. 1992. 672 с., ил.

13. Войтович, И. Д. Сенсоры на основе плазмонного резонанса: принципы, технологии, применения. - К. : Сталь, 2011. - 534 с.
14. Surface Plasmon Resonance Based Sensors/Volume Editor: Jiri Homola. In: Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Series Editor: O. S.Wolfbeis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006.
15. Kretschmann E., Raether H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light // Naturforschung. - 1968. – Vol.123. - P.2135-2136.
16. Otto A (1968) Zeits Phys 216:398
17. Born M, Wolf E (1999) Principles of optics: electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light. Cambridge University Press, Cambridge
18. Palik E. Handbook of optical constants of solids. – London, 1985.
19. Deck RT, Sarid D, Olson GA, Elson JM (1983) Appl Opt 22:3397
20. Tobiřska P (2005) PhD Dissertation, Charles University, Prague
21. Аззам Р., Башара Н. Эллипсометрия и поляризованный свет. – М.: Мир, 1981. – 583 с.
22. Chegel V. I. Experimental investigations and computer modelling of the photochemical processes in Ag-As₂S₃ structures using surface plasmon resonance spectroscopy / V. I. Chegel, Yu. M. Shirshov, S. O. Kostyukevich [et al.] // Semiconductor Physics, Quantum Electronics & Optoelectronics. – 2001. – Vol. 4 (4). – P. 301–306.
23. Homola, J. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison [Text] / J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz // Sensors and Actuators B. – 1999. – Vol. 54. – P. 3-15.
24. Homola, J. Surface plasmon resonance sensors based on diffraction gratings and prism couplers: sensitivity comparison [Text] / J. Homola, I. Koudela, S. S. Yee // Sensors and Actuators B. – 1999. – Vol. 54. – P. 16-24.

25. Gupta, G. Tuning and sensitivity enhancement of surface plasmon resonance sensor [Text] / G. Gupta, J. Kondoh // Sensors and Actuators B. – 2007. – Vol. 122. – P. 381-388.
26. Shalabney, A. Electromagnetic field distribution in multilayer thin film structures and the origin of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance sensors [Text] / A. Shalabney, I. Abdulhalim // Sensors and Actuators A. – 2010. – Vol. 159. – P. 24-32.
27. C.J. Alleyne, A.G. Kirk, R.C. McPhedran, N.-A.P. Nicorovici, D. Maystre, Opt. Express 15, 8193-8169 (2007).
28. G.G. Nenninger, P. Tobiska, J. Homola, S.S. Yee, Sensors and Actuators B 74, 145-151 (2001).
29. R. Slavik, J. Homola, Sensors and Actuators B 123, 10-12 (2007).
30. D. Lepage, J.J. Dubowski. Miniaturized Quantum Semiconductor surface plasmon resonance platform for detection of biological molecules // Biosensors. – 2013. Vol.3. – P.201-210.

До розділу 3:

1. Войтович, И. Д. Сенсоры на основе плазмонного резонанса: принципы, технологии, применения. - К. : Сталь, 2011. - 534 с.
2. Homola J (2003) Anal Bioanal Chem 377:528.
3. Matsubara K, Kawata S, Minami S (1988) Appl Spect 42:1375.
4. Zhang LM, Uttamchandani D (1988) Electron Lett 24:1469.
5. Nylander C, Liedberg B, Lind T (1982) Sensor Actuator 3:79.
6. Brockman JM, Nelson BP, Corn RM (2000) Ann Rev Phys Chem 51:41.
7. Kruchinin AA, Vlasov YG (1996) Sensor Actuator B Chem 30:77.
8. Shalabney, A. Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors [Text] / A. Shalabney, I. Abdulhalim // Laser Photonics Rev. – 2011. – Vol. 5, No.4. – P. 571-606.

9. Surface Plasmon Resonance Based Sensors/Volume Editor: Jiri Homola. In: Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Series Editor: O. S.Wolfbeis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006.
10. Ho C, Robinson A, Miller D, Davis M (2005) *Sensors* 5:4; Tumolo T, Angnes L, Baptista MS (2004) *Anal Biochem* 333:273.
11. de Feijter JA, Benjamins J, Veer FA (1978) *Biopolymers* 17:1759.
12. Jonsson U., Fagerstam L., Ivarsson B. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology // *BioTechniques*. – 1991. – Vol.11 – P.620-627.
13. Woodbury R.G., Wendin C., Clendenning J., Mendelez J., Elkind J., Bartholomew D., Brown S., Furlong C. Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniatureintegrated surface plasmon resonance sensor // *Biosensors and Bioelectronics*. – 1998. – Vol.13 – P.1117-1126.
14. www.micro-analytical systems.de
15. Homola J. The sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation // *Sensors and Actuators, B*. – 1997. – Vol.41 – P.207-211.
16. Ho H.P., Wu S.Y., Yang M., Cheung A.C. Application of white light-emitting diode to surface plasmon resonance sensors // *Sensors and Actuators, B*. –2001. – Vol.80 – P.89-94.
17. Nikitin P.I.; Beloglazov A.A.; Valeiko M.V., Creighton J.A., Wright J.D. Silicon-based surface plasmon resonance combined with surface-enhancement Raman scattering for chemical sensing // *Rev. Sci. Instrum.* –1997.- Vol.68. – P.2254-2257.
18. Nikitin P.I.; Grigorenko A.N.; Beloglazov, A.A.; Valeiko M.V.; Savchuk A.I.; Savchuk O.A. Surface plasmon resonance interferometry for micro-array biosensing // *Proc. EUROSENSORS XIII*. –1999.- P.235-238.
19. Slavik R., Homola J., Ctyroky J., Brynda E. Novel spectral fiber optic sensor based on surface plasmon resonsnce // *Sensors and Actuators, B*. – 2001. – Vol.74 – P.106-111.

20. Stamm Ch.; Dangel R.; Lukosz W. Biosensing with integrated-optical difference interferometer: dual-wavelength operation // Opt. Comm. –1988.- Vol.153. – P.347-359.
21. Janunts N.A., Markarian Sh.A., Nekarayan Kh.V. A chemo-optical sensor based on coupling of surface plasmon modes // Sensors and Actuators, A. – 2001. – Vol.89 – P.205-209.
22. Urashi T., Arakawa T. Detection of lower hydrocarbons by means of surface plasmon resonance // Sensors and Actuators, B. – 2001. – Vol.76 – P.32-35.
23. Пат. PCT(WO) 92/05426, Biological sensors, G01N 21/55, 04. 02. 1992.
24. Пат. 2197068 (8725502), G01N 33/543, Optical sensor device, Великобритания (GB) 10. 30. 1987.
25. Пат. PN GB2247749 МКИ.: G01N-021-75, Bio sensor utilizing surface plasmon resonance, 10.06.1993.
26. Пат. PN WO93-06463 МКИ.: G01N021-55, Optical Sensor, S.J.Peacock, H.C.Jaggers, J.S.Shaw, 12.01.1994.
27. *Palagushkin, A. N. Plasmonic Holographic Nanostructures [Text] / A. N. Palagushkin, S. A. Prokopenko, A. P. Sergeev // Optical Memory and Neural Networks (Information Optics) – 2009. – Vol. 18, No. 3. – P. 156–163.*
28. *Shirshov, Yu. M. Bimetallic layers increase sensitivity of affinity sensors based on surface plasmon resonance [Text] / Yu. M. Shirshov, A. V. Samoylov, S. A. Zinyo, E. R. Surovceva, V. Mirskiy // Sensors. – 2002.– Vol. 2, – P. 62-70.*
29. *Ушенін, Ю. В. Увеличение чувствительности сенсоров изменения показателя преломления среды на основе поверхностного плазмонного резонанса [Текст] / Ю. В. Ушенін, А. В. Самойлов, Р. В. Христосенко // Технология и конструирование в электронной аппаратуре. – 2011. – №1 – С. 12-14.*
30. Тугов Н.М. Полупроводниковые приборы: ученик для вузов /Н.М. Тугов, Б.А. Глебов, Н.А. Чарыков; Под. ред.. В.А. Лабунцова. – М.: Энергоатомиздат, 1990. – 576 с.: ил.

31. Викулин И.М., Стафеев В.И. Физика полупроводниковых приборов. – М.: Сов. радио, 1980. – 296 с., ил.
32. Байбородин Ю.В. Основы лазерной техники. – 2-е изд. перераб. И доп. – К.: Выща шк. Головное изд-во, 1988. – 383 с.
33. Лазери в контрольно-вимірювальній техніці / П.М. Таланчук, С.П. Голубков, В.П. Маслов та ін. – К.: Техніка, 1992. – 367 с. Мова рос.
34. Кулагин В.В. Основы конструирования оптических приборов: Учеб.пособие для приборостроительных вузов. – Л.: Машиностроение, 1982. – 312 с., ил.
35. Готра З.Ю., Матвиив В.И., Паскур П.П. Справочник регулировщика радиоэлектронной аппаратуры. – Львов.: Каменяр, 1987. – 184 с., рис., табл.
36. Ширшов Ю.М., Самойлов А.В., Христосенко Р.В., Ушенин Ю.В., Мирский В.М. Анализ и численное моделирование ППР-спектрометров с механической разверткой по углу: алгоритм определения угловой позиции минимума. // *Реєстрація, зберігання і обробка даних*. – 2004. – 6, №3.- С.3-18.
37. Özdemir S. K. Temperature Effects on Surface Plasmon Resonance: Design Considerations for an Optical Temperature Sensor / S. K. Özdemir, G. Turhan-Sayan // *Journal of light wave technology*. – 2003. – V.21, 3. – pp. 805-815.

До розділу 4:

1. A.V. Zayats, I. I. Smolyaninov, and A.A. Maradudin, Phys. Rep. 408, 131–314 (2005).
2. J.M. Pitarke, V.M. Silkin, E.V. Chulkov, and P.M. Echenique, Rep. Prog. Phys. 70, 1–87 (2007).
3. I. Abdulhalim, M. Zourob, and A. Lakhtakia, Electromagnetics (UK) 28, 214–242 (2008).

4. H. Raether, Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings, Springer Tracts in Modern Physics, Vol. 111 (Springer, Berlin Heidelberg New York, 1988).
5. B. Liedberg, C. Nylander, and I. Ljunstrom, Sens. Actuators 4, 299–304 (1983).
6. C. E.H. Berger, T.A.M. Beumer, R. P.H. Kooyman, and J. Greve, Anal. Chem. 70, 703–706 (1998).
7. K.A. Peterlinz, and R.M. Georgiadis, T.M. Herne, and M. J. Tarlov, J. Am. Chem. Soc. 119, 3401–3402 (1997).
8. V. Owen, Biosens. Bioelectron. (UK) 12(1), i–ii (1997).
9. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, Sens. Actuators B 54, 3–15 (1999).
10. J. Homola, Anal Bioanal. Chem. 377, 528–539 (2003).
11. E.M. Yeatman, Biosens. Bioelectron. (UK) 11, 635–649, (1996).
12. A.A. Kolomenskii, P.D. Gershon, and H.A. Schuessler, Appl. Opt. 36, 6539–6547 (1997).
13. J.M. McDonnell, Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 572–577 (2001).
14. A.N. Naimushin, S.D. Soelberg, D.K. Nguyen, L. Dunlap, D. Bartholomew, J. Elkind, J. Melendez, and C. E. Furlong, Biosens. Bioelectron. (UK) 17, 573–584 (2002).
15. Y. Sun, and Y. Xia, Anal. Chem. 74, 5297–5305 (2002).
16. A. P. F. Turner, Science 290, 1315 – 1317 (2000).
17. A. J. Haes, and R. P. VanDuyne, Mat. Res. Soc. Symp. Proc. 723, O3.1.1–6 (2002).
18. T. R. Jensen, R. P. VanDuyne, S.A. Johnson, and V.A. Maroni, Appl. Spectrosc. 54(7), 88A–113A, 331–459, 371–377 (2000).
19. W. P. Hu, S. -J. Chen, K. -T. Huang, J.H. Hsu, W.Y. Chen, G. L. Chang, and K. -A. Lai, Biosens. Bioelectron. (UK) 19, 1465–1471 (2004).
20. Kurihara K., Nakamura K., Suzuki K. Asymmetric SPR sensor response curve-fitting equation for the accurate determination of SPR resonance angle // Sensors and Actuators B, Chemical. - 2002. – Vol.86. - P.49-57.

21. De Bruijn H.E., Kooyman R.P.H., Greve J. Choice of metal and wavelength for surface-plasmon resonance sensors: some considerations // *Applied Optics*. - 1992. – Vol.31, №4. - P.440-442.
22. Davies J. Surface plasmon resonance - the technique and its applications to biomaterial processes // *Nanobiology*. - 1994. – Vol.3. - P.5-16.
23. Salamon Z., Macieod H.A., Tollin G. Surface plasmon resonance spectroscopy as a tool for investigating the biochemical and biophysical properties of membrane protein systems. II: Applications to biological systems // *Biochimica et biophysica acta*. - 1997. - №1331. - P. 131-152.
24. Тун Р.Э. Структура тонких пленок // *Физика тонких пленок*. - т. 1. - М.: Мир, 1967. - С. 224-274.
25. Точицкий Э.И. Кристаллизация и термообработка тонких пленок. - Минск: Наука и техника, 1976. - 376 с.
26. Herrasti P., Ocon P., Vazquez L., Vara J.M., Arvia A.J. Scanning-tunneling-microscopy study on the growth mode of vapor-deposited gold films // *Physical Review A*. - 1992. - 45(10). - P. 7440-7447.
27. Verkerk M.J., Raaijmakers I.J.M.M. Topographic characterization of vacuum-deposited films by optical methods // *Thin Solid Films*. - 1985. - 124. - P. 271-275.
28. Vijayakumar K.P., Purushothaman C. Effect of annealing on the reflectivity of silver films // *Thin Solid Films*. - 1981. - 82. - P. 225-227.
29. Kovalenko S.A. Optical properties of thin metal films // *Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics*. - 1999. - 2(3). - P. 13-20.
30. Хевенс О.С., Измерение оптических констант тонких пленок // *Физика тонких пленок*. - т.2. - М.: Мир, 1967, С.136-186.
31. Абелес Ф. Оптические свойства металлических пленок // *Физика тонких пленок*. - т. 6. - М.: Мир, 1973. - С. 171-227.

32. Parmigiani F., Scagliotti M., Samoggia G., Ferraris G. P. Influence of the growth conditions on the optical properties of thin gold films // *Thin Solid Films*. - 1985. - 125. - P. 229-234.
33. Guo L.-H., Facci J.S., McLendon G., Mosher R. Effect of gold topography and surface pretreatment on the self-assembly of alkanethiol monolayers // *Langmuir*. - 1994. - 10. - P. 4588-4593.
34. Д.Л. Миллс. Поверхностные поляритоны / Под ред. В.М. Аграновича, - М.: Наука, 1985. - 525 с.
35. Кособукин В.А. Эффект усиления внешнего электрического поля вблизи поверхности металлов и его проявление в спектроскопии // *Поверхность. Физика, химия, механика*. - 1983. - 12. - С. 5-21.
36. Braundmeier A.J., Arakawa E.T. Effect of surface roughness on surface plasmon resonance adsorption // *Journal Physics Chemistry Solids*. - 1974. - 35. - P. 517-520.
37. Weber W.H. Modulated surface-plasmon resonance for in situ metal-film surface studies // *Physical Review Letters*. - 1977. - 39. - P. 153-156.
38. Палатник Л.С., Черемской П.Г., Фукс М.Я. Поры в пленках. - М.: Энергоиздат, 1982. - 216 с.
39. Грег С., Синг К. Адсорбция, удельная поверхность, пористость. - М.: Мир, 1984. - 306 с.
40. Benjamin B.P., Weaver C. The adhesion of evaporated metal films on glass // *Proc. Roy. Soc. A*. - 1961. - 261(7). - P. 516-531.
41. Тонкие пленки. Взаимная диффузия и реакции / Под ред. Д. Поута, К.Т.Д. Мейера. - М.: Мир, 1982. - 352 с.
42. Идчак Е.Ф. Оптические свойства двойных металлических пленок // *Оптика и спектроскопия*. - 1967. - 22(6). - С. 935-939.
43. Холлэнд Л. Нанесение тонких пленок в вакууме. - М.-Л.: Государственное энергетическое издательство, 1963. - 608 с.

44. Идчак Е.Ф. Влияние условий возгонки на оптические свойства токих пленок хрома // Оптика и спектроскопия. - 1963. - 15(1). - С. 107- 112.
45. Аззам Р., Башара Н. Эллипсометрия и поляризованный свет. – М.: Мир, 1981. – 583 с.
46. Р.Фейнман, Р.Лейтон, М.Сэндс. Фейнмановские лекции по физике. Физика сплошных сред. – М.: Наука, 1961. - 286 с., ил.
47. Самойлов А.В. Біметалічні плівки в сенсорних пристроях на основі явища поверхневого плазмонного резонансу // Дисертаційна робота.
48. Shirshov Yu.M., Samoylov A.V., Zinyo S.A., Surovceva E.R., Mirskiy V. Bimetallic Layers Increase Sensitivity of Affinity Sensors Based on Surface Plasmon Resonance // Sensors – 2002.– Vol.2, – 62-70.
49. Северденко В.П., Точицкий Э.И. Структура тонких металлических пленок. - Минск.: Наука и техника, 1968. - 212 с.
50. Технология тонких пленок (справочник), 1 том/ Под ред. Л. Майссела, Р.Глэнга. - М.: Советское радио, 1977. - 662 с.
51. Маслов В.П. Фізико-технологічні проблеми з'єднання прецизійних деталей оптико-електронних приладів: моногр. / В. П. Маслов. – К.: НТУУ «КПІ», 2012. – 160 с. – Бібліогр.: с. 148 – 159. – 400 пр.
52. Костюк В.П., Шкляревский И.Н. Влияние условий приготовления серебряных и медных слоев на их оптические свойства // Оптика и спектроскопия. - 1970. - 29(1). - С. 195-197.
53. Вишняков Я.Д. Дефекты упаковки в кристаллической структуре, М.: Наука, 1970. - 278 с.
54. Snopok B.A., Kostyukevich E.V., Lysenko S.I., Lytvyn P.M., Lytvyn O.S., Mamykin S.V., Zynio S.A., Kostyukevich S.A., Shepeliavii P.E., Shirshov Yu.M., Venger E.F Optical biosensors based on the surface plasmon resonance phenomenon: optimization of the metal layer parameters // Semiconductor Physics, Quantum Electronics and Optoelectronics. - 2001. - v.4. - № 1. - p. 56-69.

55. J. Homola. Present and future of surface plasmon resonance biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. - Vol.377. – PP. 528-539.
56. K.-H.A. Lau, L.-S. Tan, K. Tamada, M.S. Sander, W. Knoll. Highly sensitive detection of processes occurring inside nanoporous anodic alumina templates: a waveguide optical study // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – Vol. 108(30). – PP.10812-10818.
57. A.G. Koutsioubas, N. Spiliopoulos, D. Anastas-Sopoulos, A.A. Vradis, G.D. Priftis. Nanoporous alumina enhanced surface plasmon resonance sensors // *J. Appl. Phys.* – 2008. – Vol. 103(9). – PP.094521-094527.
58. Э.Б.Каганович, Э.Г.Манойлов, И.Р.Базылюк, С.В.Свечников. Спектры фотолюминесценции нанокристаллов кремния // *ФТП.* – 2003. - №37(3). – СС.353-357.
59. E.B. Kaganovich, D.V. Korbutyak, Yu.V. Kryuchenko, I.M. Kupchak, E.G. Manoilo and A.V. Sachenko. Exciton states and photoluminescence in Ge quantum dots // *Nanotechnology.* – 2007. – Vol.18. – PP.295401-295405.
60. Планарные волноводные структуры на основе нанопористых пленок оксида алюминия в условиях поверхностного плазмонного резонанса / Ю.В. Ушенин, Р.В. Христосенко, А.В. Самойлов, Ю.С. Громовой, Э.Б. Каганович, Э.Г. Манойлов, С.А. Кравченко, Б.А. Снопков // *Оптоэлектроника и полупроводниковая техника.* – 2011. – Вып. 46. – С. 33 – 40.
61. Ю.В. Ушенін, Р.В. Христосенко, А.В. Самойлов, Ю.С. Громовой, Е.Б. Каганович, Е.Г. Манойлов, С.О. Кравченко, Б.А. Снопков. Тонкі плівки пористого оксиду алюмінію, одержані імпульсним лазерним осадженням, для поверхневих плазмон-поляритонних сенсорних структур // *Фізика і хімія твердого тіла.* – 2012. – Т.13, №1. – С.259-264.
62. V.P.Kladko, O.Y.Gudymenko, S.B.Kriviyy, P.M.Litvin, E.B. Kaganovich, I.M. Krishchenko, E.G. Manoilo. Reflectometry study of nanoporous films with

- arrays of gold nanoparticles // Ukrainian Journal Physics. – 2014. – Vol.59(9). – PP. 915-921.
63. А.И. Гудыменко, С.Б. Кривой, Г.В. Станчу, В.П. Кладько, Н.В. Сафрюк, Н.В. Слободян. Исследование плазмонных плёночных наноструктур золота методами рентгеновской рефлектометрии и дифрактометрии // Металлофиз. новейшие технол. – 2015. – Т.37, №9. – PP. 1215-1223.
 64. R. Yang, X. Huang, Z. Lu. Arbitrary Super Surface Modes Bounded by Multilayered Metametal // Micromachines. – 2012. – Vol.3. – PP.45-54. doi:10.3390/mi301004
 65. P. Slepicka, I. Michaljanicová, V. Ivorčík. Controlled biopolymer roughness induced by plasma and excimer laser treatment // Express polymer letters. – 2013. – Vol.7, №.11. – PP.950-958. DOI: 10.3144/expresspolymlett.2013.92
 66. Nan-Fu Chiu, Yi-Chen Tu, Teng-Yi Huang. Enhanced Sensitivity of Anti-Symmetrically Structured Surface Plasmon Resonance Sensors with Zinc Oxide Intermediate Layers // Sensors. - 2014. Vol.14. – PP.170-187. doi:10.3390/s140100170
 67. D. Tanaka, S. Shinohara, E. Usukura, P.Wang, K. Okamoto, K. Tamada. High-sensitivity surface plasmon resonance sensors utilizing high-refractive-index silver nanoparticle sheets // Japanese Journal of Applied Physics. – 2014. – Vol.53. – PP. 01AF01-01AF07.
 68. M.C. Navarrete, N. Díaz-Herrera, A. González-Cano, Ó. Esteban. Surface plasmon resonance in the visible region in sensors based on tapered optical fibers. // Sensors and Actuators, B Chemie. – 2014. – Vol.190. – PP. 881-885.
 69. O. Esteban, F.B. Naranjo, N. Díaz-Herrera, S.Valdúeza-Felip, M.C. Navarrete, A. González-Cano. High-sensitive SPR sensing with Indium Nitride as a dielectric overlay of optical fibers // Sensors and Actuators, B Chemie. – 2011. – Vol.158. – PP. 372-376.

70. Sutherland R.M., Dahne C. IRS devices for optical immunoassays // Biosensors. Fundamentals and applications. - New York: Oxford University Press, 1989. - P. 655-678.
71. Ramsden J.J. Optical Biosensors // Journal of molecular recognition. - 1997. - 10. - P. 109-120.
72. Пат. 5,922,594 США, МКК C 12 M 1/34. Method of producing bilayer lipid membranes / Stefan Lofas (Sweden); Biacore. - 13.07.99.
73. Raguse B., Braach-Maksyutis V., Cornell B.A., King L.G., Osman P.D.J., Pace R.J., Wiczorek L. Tethered lipid bilayer membranes: formation and ionic reservoir characterization // Langmuir. - 1998. - 14. - P. 648-659.
74. Liedberg B., Lundstrom I., Stenberg E. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance // Sensors and Actuators B. - 1993. - 11. - P. 63-72.
75. Crooks R.M., Ricco A.J. New organic materials suitable for use in chemical sensor arrays // Acc. Chem. Res. - 1998. - 31. - P. 219-227.
76. Lofas S., Johnsson B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands // J. Chem. Soc., Chem. Commun. - 1990. - P. 1526-1528.
77. Seigel R.S., Hrder P., Dahinf R., Gruuze M., Josse F., Mrksich M., Whitesides G.M. On-line detection of nonspecific protein adsorption at artificial surfaces // Anal. Chem. - 1997. - 69. - P. 3321-3328.
78. Daniels P.B., Deacon J.K., Eddowes M.J., Pedley D.G. Surface plasmon resonance applied to immunosensing // Sensors and Actuators. - 1988. - 15. - P. 11-18.
79. Arisumi K., Feng F., Miyashita T., Ninomiya H. Functionalization of polymer Langmuir-Blodgett films using active ester groups // Langmuir. - 1998. - 14. - P. 5555-5558.
80. Davies J., Allen A., Bruce I., Burrows Y., Heaney P.J., Hemming F., Nunnerley C.S., Scelton L. Dynamic, in-situ, techniques for probing surface

properties of biomaterials // Proc. International Conf. on Surface Properties of Biomaterials. - Butterworth Heinemann. - 1992. - P. 75-78.

81. Lopez G.P., Biebuyck H.A., Harter R., Kumar A., Whitesides G.M. Fabrication and imaging of two-dimensional patterns of proteins adsorbed on self-assembled monolayers by scanning electron microscopy // J. Am. Chem. Soc. - 1993. - 115. - P.10774-10781.
82. Решетилов А.Н., Егоров А.М. Иммунохимические сенсоры на основе потенциометрических полупроводниковых преобразователей // Итоги науки и техники. - серия Биотехнология.- 26. - М.: ВИНТИ. - 1990. - С. 36-41.
83. Пат. 5,922,594 США, МКИ С 12 М 1/34. Method of producing bilayer lipid membranes / Stefan Lofas (Sweden); Biacore. - 13.07.99.
84. Пат. 5,492,840 США, МКИ G 01 N 33/543, G 01 N 33/551, G 01 N 33/553. Surface plasmon resonance sensor unit and its use in biosensor systems / Magnus Malmqvist et al.(Sweden); Pharmacia Biosensor. - 20.02.96.
85. Johnsson B., Lofas S., Lindquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors // Analytical Biochemistry. - 1991. - 198. - P. 268-277.
86. Lofas S., Johnsson B., Tegendal K., Ronnberg I. Dextran modified gold surfaces for surface plasmon resonance sensors: immunoreactivity of immobilized antibodies and antibody-surface interaction studies // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. - 1993. - 1. - P. 83-89.

До розділу 5:

1. A.D.Rakic, A.B. Djurisic, J.M. Elazar, M.L. Majewski. Optical properties of metallic films for vertical-cavity optoelectronic devices. Appl.Opt. 37, 5271-5283(1998).

2. Аззам Р., Башара Н. Эллипсометрия и поляризованный свет. – М.: Мир, 1981. – 583 с.
3. Фізичні основи поляриметрії високої інформативної здатності: монографія / Г. В. Бекетов, О. С. Климов, І. Є. Матяш та ін.; під.ред. Б. К. Сердеги. – К.: НТУУ «КПІ», 2013. – 252 с. – 100 пр.
4. Ширшов Ю.М., Самойлов А.В., Христосенко Р.В., Ушенин Ю.В., Мирский В.М. Анализ и численное моделирование ППР-спектрометров с механической разверткой по углу: алгоритм определения угловой позиции минимума. // *Реєстрація, зберігання і обробка даних*. – 2004. – 6, №3.- С.3-18.
5. Зенкин А.С., Петко И.В. Допуски и посадки в машиностроении: Справочник. – К.: Техніка, 1984. – 311 с., ил. – Библиогр.: с. 311.
6. Shalabney, A. Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors /A. Shalabney, I. Abdulhalim // *Laser Photonics Rev.* – 2011. – Vol.5, No.4. – P. 571-606.
7. Байбородин Ю.В. Основы лазерной техники. – 2-е изд. перераб. И доп. – К.: Выща шк. Головное изд-во, 1988. – 383 с.
8. Özdemir S. K. Temperature Effects on Surface Plasmon Resonance: Design Considerations for an Optical Temperature Sensor / S. K. Özdemir, G. Turhan-Sayan // *Journal of light wave technology*. – 2003. – V.21, 3. – pp. 805-815.
9. Глаголев С.П. Кварцевое стекло. Свойство, производство, применение. Под.ред.проф. Н.Н.Яроцкого. – М.: ГХТИ, 1934. – 216 с.,ил.
10. Краткий справочник физико-химических величин. Изд.8 под.ред. А.А. Ревдедя и А.М. Пономарёвой. – Л.: Химия, 1983, С.14.
11. Дорожинський Г.В., Ушенін Ю.В., Самойлов А.В., Христосенко Р.В., Громовой Ю.С., Зиньо С.А., Маслов В.П. Прилад для аналізу біохімічних середовищ, патент України на корисну модель № 76774 від 10.01.2013, бюл. №1.

12. N.-H. Kim, M. Choi, J.W. Leem, J.S. Yu, T.W. Kim, T.-S. Kim, K.M. Byun. Improved biomolecular detection based on a plasmonic nanoporous gold film fabricated by oblique angle deposition // Optics Express. – 2015. – Vol.23, No.14. – P.18777-18785.
13. Dorozinsky G., Doroshenko T., Maslov V. Influence of technological factors on sensitivity of analytical devices based on surface plasmon resonance // Journal of Sensor Technology. – 2015. – Vol.5. – P.54-61.
14. Дорожинський Г.В., Маслов В.П. Прилад для аналізу рідких та газоподібних середовищ, патент України на винахід № 108149 від 25.03.2015, бюл. №6.
15. Планарные волноводные структуры на основе нанопористых пленок оксида алюминия в условиях поверхностного плазмонного резонанса / Ю.В. Ушенин, Р.В. Христосенко, А.В. Самойлов, Ю.С. Громовой, Э.Б. Каганович, Э.Г. Манойлов, С.А. Кравченко, Б.А. Снопков // Оптоэлектроника и полупроводниковая техника. – 2011. – Вып. 46. – С. 33 – 40.
16. Ю.В. Ушенін, Р.В. Христосенко, А.В. Самойлов, Ю.С. Громовой, Е.Б. Каганович, Е.Г. Манойлов, С.О. Кравченко, Б.А. Снопков. Тонкі плівки пористого оксиду алюмінію, одержані імпульсним лазерним осадженням, для поверхневих плазмон-поляритонних сенсорних структур // Фізика і хімія твердого тіла. – 2012. – Т.13, №1. – С.259-264.
17. Ушенин Ю.В., Христосенко Р.В., Самойлов А.В., Дорожинский Г.В., Каганович Э.Б., Манойлов Э.Г., Снопков Б.А. Оптоэлектронные сенсорные структуры на основе пленок пористого оксида алюминия, полученных импульсным лазерным осаждением // Оптоэлектроника и полупроводниковая техника. – 2012 – № 47. – С.40-45.
18. Вакарюк Т.Є., Громовой Ю.С., Данько В.А., Дорожинський Г.В., Зиньо С. А., Індутний І.З., Самойлов А.В., Ушенін Ю.В., Христосенко Р.В., Шепелявий П. Є. Використання поруватих плівок SiOx в сенсорах на

- основі поверхневого плазмонного резонансу // Оптоэлектроника и полупроводниковая техника. – 2013 – № 48. – С.89-95.
19. J.M. Garcia-Martin, R. Alvarez, P. Romero-Gomez, A. Cebollada, and A. Palmero. Tilt angle control of nanocolumns grown by glancing angle sputtering at variable argon pressures // Appl. Phys. Lett. – 2010.- 97, 173103-1-3.
 20. B. Tanto, G. Ten Eyck, and T.-M. Lu. A model for column angle evolution during oblique angle deposition // Journ. Appl. Phys. – 2010.- 108, 026107-1-3.
 21. Фазово-структурные превращения в пленках SiO_x в процессе вакуумных термообработок / И.П. Лисовский, И.З. Индутный, Б.Н. Гненный и др.// ФТП.- 2003.- 37, в.1.- С.98 –103.
 22. Infrared absorption spectra and compositions of evaporated silicon oxides (SiO_x) / M. Nakamura, V. Mochizuki, K. Usami, et. all // Solid State Communications.-1984.-50, N12.- P. 1079 - 1081.
 23. Дорожинський Г.В., Данько В.А., Шепелявий П.С., Христосенко Р.В., Стеценко М.О. Прилад для аналізу біомолекулярних середовищ, патент України на корисну модель № 87271 від 27.01.2014, бюл. №2.
 24. De Bruijn H.E., Kooyman R.P.H., Greve J. Choice of metal and wavelength for surface-plasmon resonance sensors: some considerations // Applied Optics. - 1992. – Vol.31, №4. - P.440-442.
 25. Патент на корисну модель № **58775** Україна, МПК МПК G01N 21/55. Самойлов А.В., Ушенін Ю.В., Христосенко Р.В. Сенсор для аналізу біохімічних середовищ. Заявл. 27.09.2010; № u201009975. Опубл. 26.04.2011. Бюл. №8.
 26. Dorozinsky G., Dunaevsky V., Maslov V. Thermal-vision method of investigations and control of device based on surface plasmon resonance // Universal Journal of Control and Automation. – 2013. - Vol.2. – P.34-39.

27. Дорожинський Г.В., Дунаєвський В.І., Маслов В.П. Спосіб підвищення точності приладу на основі явища поверхневого плазмонного резонансу, патент України на корисну модель № 84770 від 25.10.2013, бюл. №20.
28. Temperature-dependent sensitivity of surface plasmon resonance sensors at the gold–water interface / C. S. Moreira et al. // *Sensors and Actuators B*. – 2008. – 134. – pp. 854–862.
29. Numerical and experimental investigation of temperature effects on the surface plasmon resonance sensor / K Lin et al. // *Chinese Optics Letters*. – 2009. – V.7, 5. – pp. 428-431.
30. Gridina N., Dorozinsky G., Khristosenko R., Maslov V., Samoylov A., Ushenin Yu., Shirshov Yu. Surface plasmon resonance biosensor // *Sensors & Transducers Journal*. – 2013. – Vol.149, № 2. – P.60-68.
31. Дорожинський Г.В., Ушенін Ю.В., Самойлов А.В., Маслов В.П. Спосіб дослідження біомолекулярних та біохімічних реакцій в рідких та газоподібних середовищах з використанням явища поверхневого плазмонного резонансу, патент України на корисну модель № 77080 від 25.01.2013, бюл. №2.
32. Dorozinsky G., Maslov V., Samoylov A., Ushenin Yu. Reducing measurement uncertainty of instruments based on the phenomenon of surface plasmon resonance // *American Journal of Optics and Photonics*. – 2013. - Vol.1, № 3. – P.17-22.

До розділу 6:

1. Liedberg B, Nylander C, Lundstrom I (1983) *Sensor Actuator* 4:299
2. Lin JN, Chang IN, Andrade JD, Herron JN, Christensen DA (1991) *J Chromatogr.* 542:41
3. Nuzzo RG, Allara J (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:4481

4. Surface Plasmon Resonance Based Sensors/Volume Editor: Jiri Homola. In: Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors, Series Editor: O. S.Wolfbeis, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2006.
5. Ulman A (ed) (1998) Thin films: self-assembled monolayers of thiols. Academic, San Diego
6. Lofas S, Johnsson B (1990) J Chem Soc Chem Commun 21:1526
7. Bergstrom J, Johnsson B, Lofas S (1990) Sensing surfaces capable of selective biomolecular interactions, to be used in biosensor systems. Patent appl. WO90/05303
8. Bishop AR, Nuzzo RG (1996) Curr Opin Colloid Interface Sci 1:127
9. Ostuni E, Chapman RG, Holmlin RE, Takayama S, Whitesides GM (2001) Langmuir 17:5605
10. Sigal GB, Mrksich M, Whitesides GM (1998) J Am Chem Soc 120:3464
11. Lofas S (1995) Pure Appl Chem 67:829
12. Lofas S, Malmqvist M, Ronnberg I, Stenberg E, Liedberg B, Lundstrom I (1991) Sensor Actuator B Chem 5:79
13. Lundstrom I (1994) Biosens Bioelectron 9:725
14. Day YSN, Baird CL, Rich RL, Myszkowski DG (2002) Protein Sci 11:1017
15. Disley DM, Blyth J, Cullen DC, You HX, Eapen S, Lowe CR (1998) Biosens Bioelectron 13:383
16. Frey BL, Corn RM (1996) Anal Chem 68:3187
17. A. Manakhov, M. Moreno-Couranjou, P. Choquet, N. Boscher, and J.-J. Pireaux, Surf. Coat. Technol. 205, S466 (2011).
18. Glib Dorozinsky, Anton Manakhov, Ekaterina Makhneva, Lenka Zajičková, Olena Shynkarenko, Gennadii Beketov. SPR study of IgG binding properties of nanolayers deposited by plasma co-polymerization of maleic anhydride and acetylene // Всеукраїнська конференція з міжнародною участю, посвячена 85-річчю з дня народження академіка НАН України Чуйка «Хімія, фізика та технологія поверхні». – 2015. – С.122.

19. Дорожинський Г.В. Виготовлення біосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу за допомогою полімеризації в плазмі // Young scientists conference on semiconductor physics "Lashkaryov's readings". – Kyiv: Ukraine. - 2015. – P.101.
20. Hermanson GT, Mallia AK, Smith PK (1992) Immobilized affinity ligand techniques. Academic, New York
21. Hermanson GT (1995) Bioconjugate techniques. Academic, New York
22. Myszka DG (1999) J Mol Recognit 12:390
23. Johnsson B, Lofas S, Lindquist G (1991) Anal Biochem 198:268
24. Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C (1991) J Colloid Interface Sci 143:513
25. Lofas S, Johnsson B, Tegendal K, Ronnberg I (1993) Colloids Surf B: Biointerfaces 1:83
26. Matson RS, Little MC (1988) J Chromatogr 458:67
27. Sprik M, Delamarche E, Michel B, Rothlisberger U, Klein ML, Wolf H, Ringsdorf H (1994) Langmuir 10:4116
28. Johnsson B, Lofas S, Lindquist G, Edstrom °A, Muller Hillgren RM, Hansson A (1995) J Mol Recognit 8:125
29. Stuchbury T, Shipton M, Norris R, Malthouse JPG, Brocklehurst K, Herbert JAL, Suschitzky H (1975) Biochem J 151:417
30. O'Shannessy DJ, Brigham-Burke M, Peck K (1992) Anal Biochem 205:132
31. Hoffman WL, O'Shannessy DJ (1988) J Immunol Methods 112:113
32. Killard AJ, Deasy B, O'Kennedy R, Smyth MR (1995) Trends Anal Chem 14:257
33. Lu B, Smyth MR, O'Kennedy R (1996) Analyst 121:29R
34. Khilko SN, Corr IN, Boyd LF, Lees A, Inman JK, Margulies DH (1993) J Biol Chem 268:15425
35. Karlsson R, Sjodin A (2004) Immobilization method and kit therefore. Patent appl. US 2004/0241724 A1

36. Smith EA, Thomas WD, Kiessling LL, Corn RM (2003) *J Am Chem Soc* 125:6140
37. Caldwell EE, Andreasen AM, Blietz MA, Serrahn JN, Vandernoot V, Park Y, Yu G, Linhardt RJ, Weiler JM (1999) *Arch Biochem Biophys* 361:215
38. Situ C, Crooks SRH, Baxter AG, Ferguson J, Elliot CT (2002) *Anal Chim Acta* 473:143
39. Sjolander S, Urbaniczky C (1991) *Anal Chem* 63:2338
40. Myszka DG (2004) *Anal Biochem* 329:316
41. Schumakaer-Perry JS, Zareie MH, Aebersold R (2004) *Anal Chem* 76:918
42. Mann CJ, Stephens SK, Burke JF (2004) Production of protein microarrays. In: Kambhampati D (ed) *Protein microarray technology*. Wiley, Weinheim
43. Jacobs JW, Fodor SPA (1994) *Trends Biotechnol* 12:19
44. Rozsnyai LF, Benson DR, Fodor SPA, Schultz PG (1992) *Angew Chem Int Ed Engl* 31:759-761
45. Delamarche E, Sundarababu G, Biebuyck H, Michel B, Gerber C, Sigrist H, Wolf H, Ringsdorf H, Xanthopoulos N, Mathieu HJ (1996) *Langmuir* 12:1997

До розділу 7

1. Mouvet C, Harris R, Maciag C, Luff B, Wilkinson J, Piehler J, Brecht A, Gauglitz G, Abuknesha R, Ismail G (1997) *Anal Chim Acta* 338:109.
2. Harris R, Luff B, Wilkinson J, Piehler J, Brecht A, Gauglitz G, Abuknesha R (1999) *Biosens Bioelectron* 14:377
3. Gobi KV, Tanaka H, Shoyama Y, Miura N (2005) *Sensor Actuator B Chem* 111–112:562
4. Nakamura C, Hasegawa M, Nakamura N, Miyake J (2003) *Biosens Bioelectron* 18:599
5. Chegel V, Shirshov Y, Piletskaya E, Piletsky S (1998) *Sensor Actuator B Chem* 48:456
6. Lim T, Oyama M, Ikebukuro K, Karube I (2000) *Anal Chem* 72:2856

7. Gobi K, Miura N (2004) *Sensor Actuator B Chem* 103:265
8. Gobi K, Tanaka H, Shoyama Y, Miura N (2004) *Biosens Bioelectron* 20:350
9. Miura N, Sasaki M, Gobi KV, Kataoka C, Shoyama Y (2003) *Biosens Bioelectron* 18:953
9. Shimomura M, Nomura Y, Zhang W, Sakino M, Lee K, Ikebukuro K, Karube I (2001) *Anal Chim Acta* 434:223
10. Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, Block ST, Harris LR (1998) *Chemosphere* 36:2149
11. Soh N, Watanabe T, Asano Y, Imato T (2003) *Sensor Mater* 15:423
12. Ambient aquatic life water quality criteria for nonylphenol – draft, EPA-822-R-03-029
13. Samsonova JV, Uskova NA, Andresyuk AN, Franek M, Elliott CT (2004) *Chemosphere* 57:975
14. Fact sheet: the drinking water contaminant candidate list – the source of priority contaminants for the drinking water EPA 815-F-05-001
15. SohN, TokudaT, WatanabeT, MishimaK, ImatoT, MasadomeT, AsanoY, OkutaniS, Niwa O, Brown S (2003) *Talanta* 60:733
16. 39. Wright J, Oliver J, Nolte R, Holder S, Sommerdijk N, Nikitin P (1998) *Sensor Actuator B Chem* 51:305
17. Choi JW, Park KW, Lee DB, Lee W, Lee WH (2005) *Biosens Bioelectron* 20:2300
18. Strong A, Stimpson DI, Bartholomew DU, Jenkins TF, Elkind JL (1999) *SPIE* 3710:362
19. Shankaran D, Gobi K, Sakai T, Matsumoto K, Toko K, Miura N (2005) *Biosens Bioelectron* 20:1750
20. Sharma RK, Agrawal M (2005) *J Environ Biol* 26:301
21. 2001 Update of ambient water quality criteria for cadmium, EPA-822-R-01-001

22. Ambient water quality criteria for copper EPA 440/5-84-031
23. Ambient water quality criteria for nickel EPA 440/5-80-060
24. Ambient water quality criteria for zinc EPA 440/5-80-079
25. Wu C, Lin L (2004) Biosens Bioelectron 20:864
26. Ock K, Jang G, Roh Y, Kim S, Kim J, Koh K (2001) Microchem J 70:301
27. Oh B, Kim Y, Lee W, Bae Y, Lee W, Choi J (2003) Biosens Bioelectron 18:605
28. Oh BK, Lee W, Chun BS, Bae YM, Lee WH, Choi JW (2005) Biosens Bioelectron 20:1847
29. Lotierzo M, Henry O, Piletsky S, Tothill I, Cullen D, Kania M, Hock B, Turner A (2004) Biosens Bioelectrons 20:145
30. Yu Q, Chen S, Taylor A, Homola J, Hock B, Jiang S (2005) Sensor Actuator B Chem 107:193
31. Аналітичні екологічні прилади та системи. — Монографія. / Під заг. ред. В. А. Порєва. - Вінниця: УНІВЕРСУМ-Вінниця, 2009.
32. Мала гірнича енциклопедія. В 3-х т. / За ред. В.С. Білецького. — Донецьк: Донбас, 2004.
33. ДСТУ 3057-95 (ГОСТ 2222-95): Метанол технічний.
34. Б.Н. Бабич, Е.В. Вершинина, В.А. Глебов. Металлические порошки и порошковые материалы. Справочник; под ред. Ю.В. Левинского. — М.: ЭКОМЕТ, 2005, с 130.
35. В. А. Сандриков. Современные подходы в оценке малого круга кровообращения — теория и практика: Лекция / В. А. Сандриков, Т. Ю. Кулагина Ультразвуковая и функцион. диагностика. — 2002., с. 126-132.
36. Дорожинский Г.В., Лобанов М.В., Маслов В.П. Обнаружение паров метанола методом поверхностного плазмонного резонанса // Восточно-Европейский журнал передовых технологий. – 2015. – Vol.4(76). – Р.4-7.

37. Center for Food Safety and Nutrition & United States Food and Drug Administration (1999) Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. US FDA
38. Fratamico PM, Strobaugh TP, Medina MB, Gehring AG (1998) *Biotechnol Tech* 12:571
39. Oh BK, Kim YK, Bae YM, Lee WH, Choi JW (2002) *J Microbiol Biotechnol* 12:780
40. Oh BK, Lee W, Lee WH, Choi JW (2003) *Biotechnol Bioprocess Eng* 8:227
41. Taylor AD, Yu QM, Chen SF, Homola J, Jiang SY (2005) *Sensor Actuator B Chem* 107:202
42. Fratamico PM, Strobaugh TP, Medina MB, Gehring AG (1999) A surface plasmon resonance biosensor for real-time immunologic detection of *Escherichiacoli*O157:H7. In: TunickM, FratamicoPM, PalumboSA(eds) *New techniques in the an alysis of foods*. Kluwer Academic, New York, p 103
43. Kai E, Sawata S, Ikebukuro K, Iida T, Honda T, Karube I (1999) *Anal Chem* 71:796
44. Kai E, Ikebukuro K, Hoshina S, Watanabe H, Karube I (2000) *FEMS Immunol Med Microbiol* 29:283
45. Spangler BD, Wilkinson EA, Murphy JT, Tyler BJ (2001) *Anal Chim Acta* 444:149
46. KoubovaV, BryndaE, KarasovaL, SkvorJ, HomolaJ, DostalekJ, TobiskaP, RosickyJ (2001) *Sensor Actuator B Chem* 74:100
47. Bokken G, Corbee RJ, van Knapen F, Bergwerff AA (2003) *FEMS Microbiol Lett* 222:75
48. Oh BK, Kim YK, Park KW, Lee WH, Choi JW (2004) *Biosens Bioelectron* 19:1497
49. Oh BK, Lee W, Kim YK, Lee WH, Choi JW (2004) *J Biotechnol* 111:1
50. Leonard P, Hearty S, Quinn J, O'Kennedy R (2004) *Biosens Bioelectron* 19:1331

51. Taylor AD, Ladd J, Yu Q, Chen S, Homola J, Jiang S (2006) *Sensor Actuator B Chem* 107:202
52. Hsieh HV, Stewart B, Hauer P, Haaland P, Campbell R (1998) *Vaccine* 16:997
53. Oh BK, Lee W, Chun BS, Bae YM, Lee WH, Choi JW (2005) *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 257–58:369
54. Oh BK, Lee W, Chun BS, Bae YM, Lee WH, Choi JW (2005) *Biosens Bioelectron* 20:1847
55. Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) *Genet Mol Res* 2:63
56. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS (1988) *Int J Food Microbiol* 7:311
57. Nedelkov D, Rasooly A, Nelson RW (2000) *Int J Food Microbiol* 60:1
88. Homola J, Dostalek J, Chen SF, Rasooly A, Jiang SY, Yee SS (2002) *Int J Food Microbiol* 75:61
59. Naimushin AN, Soelberg SD, Nguyen DK, Dunlap L, Bartholomew D, Elkind J, Melen dez J, Furlong CE (2002) *Biosens Bioelectron* 17:573
60. Slavik R, Homola J, Brynda E (2002) *Biosens Bioelectron* 17:591
61. Nedelkov D, Nelson RW (2003) *Appl Environ Microbiol* 69:5212
62. Medina MB (2003) *J Rapid Methods Automat Microbiol* 11:225
63. Naimushin AN, Soelberg SD, Bartholomew DU, Elkind JL, Furlong CE (2003) *Sensor Actuator B Chem* 96:253
64. Medina MB (2005) *J Rapid Methods Automat Microbiol* 13:3
65. Lotierzo M, Henry OYF, Piletsky S, Tothill I, Cullen D, Kania M, Hock B, Turner APF (2004) *Biosens Bioelectron* 20:145
66. Yu QM, Chen SF, Taylor AD, Homola J, Hock B, Jiang SY (2005) *Sensor Actuator B Chem* 107:193
67. Mullett W, Lai EPC, Yeung JM (1998) *Anal Biochem* 258:161
68. Tudos AJ, Lucas-van den Bos ER, Stigter ECA (2003) *J Agric Food Chem* 51:5843 49.

69. Choi GH, Lee DH, Min WK, Cho YJ, Kweon DH, Son DH, Park K, Seo JH (2004) Protein Expr Purif 35:84
70. Daly SJ, Keating GJ, Dillon PP, Manning BM, O'Kennedy R, Lee HA, Morgan MRA (2000) J Agric Food Chem 48:5097
71. Dunne L, Daly S, Baxter A, Haughey S, O'Kennedy R (2005) Spectrosc Lett 38:229
72. Нина Гридина, Владимир Маслов, Юрий Ушенин. Опухоль-ассоциированное воспаление и глиомы головного мозга. Lambert Academic Publishing, Saarbrücken, 2013, 196 стр. ISBN 978-3-659-36794-6
73. Білошицький В.В., Морозова А.М., Розуменко В.Д., Драгунцова Н.Г., Величко О.М., Веселова О.І., Маслов В.П., Ушенін В.Ю. Застосування верапамілу та кетаміну в експерименті на щурах зі щепленою гліомою 101.8 // Укр.Мед.Вісті. – 2014. – Т.11, № 1-4. – С.8083.
74. Патент на корисну модель № 43470 МПК G01N 21/00. Спосіб кількісного визначення агрегації клітин периферичної крові методом поверхневого плазмонного резонансу, Гридіна Н.Я., Ушенін Ю.В., Нахаба О.О., Рябінська О.О. Заявл. 13.11.2008; Опубл. 25.11.2009, Бюл. №16, 2009.
75. Е. Самойленко, С. Залеток, С. Гоголь, А. Орловский, Ю. Ушенин, Г. Бекетов, А. Самойлов, Р. Христосенко, Г. Дорожинский, Л. Гулуа, Определение содержания белков фактора транскрипции NF-κB и продуктов зависящих от него генов в экстрактах клеток животных с помощью поверхностного плазмонного резонанса // Тези 5-ї між нар. н.-тех. конф. Сенсорна електроніка та мікросистемні технології (СЕМСТ-5).- Одеса (Україна).- 2012.- №46.-С. 199.
76. Стародуб М.Ф., Пирогова Л.В. Спосіб діагностики вірусного лейкозу великої рогатої худоби імуносенсором на основі поверхневого плазмонного резонансу, патент України на винахід № 53267 від 15.11.2006, бюл. №11.

77. Венгер Є.Ф., Маслов В.П., Ушенін Ю.В., Самойлов А.В., Дорожинський Г.В., Громовой Ю.С., Клестова З.С., Бабкін М.В., Годовський О.В. Спосіб діагностики лейкозу великої рогатої худоби, патент України на корисну модель № 96997 від 25.02.2015, бюл. №4.
78. Маслов В.П. Фізико-технологічні проблеми з'єднання прецизійних деталей оптико-електронних приладів: моногр. / В. П. Маслов. – К.: НТУУ «КПІ», 2012. – 160 с. – Бібліогр.: с. 148 – 159. – 400 пр.
79. Dorozinsky G. Surface plasmon resonance as a tool for research in nanotechnology and industry. // “Machines.Technologies.Materials” Journal. – 2013. – Vol.9. – P.51-54.
80. Dorozinsky G.V., Liptuga A.I., Gordienko V.I., Maslov V.P, Pidgorny V.V. Diagnostics of motor oil quality by using the device based on surface plasmon resonance phenomenon // Scholars Journal of Engineering and Technology (SJET). – 2015. – Vol.3. – P.372-374.
81. Дорожинський Г.В., Маслов В.П., Качур Н.В., Філончук Р.Л. Багатоканальний детектор задимленості, патент України на корисну модель № 91922 від 25.07.2014, бюл. №14.